



TESIS DOCTORAL

Bases celulares del envejecimiento en colon y páncreas. Papel del tratamiento con melatonina.

Francisco Eduardo Martín Cano

Departamento de Fisiología

D^a María José Pozo Andrada, Profesora Catedrática del Departamento de Fisiología de la Facultad de Enfermería y T.O. de la Universidad de Extremadura y D. Pedro Javier Camello Almaraz, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

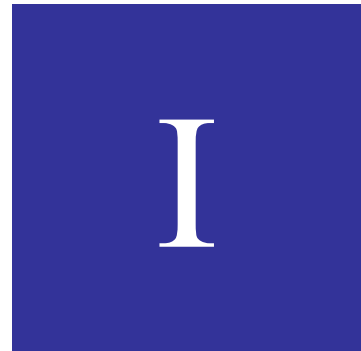
Expresan su conformidad para la tramitación de la presente tesis doctoral.

Fdo: María José Pozo Andrada

Fdo: Pedro Javier Camello Almaraz

Año 2013

Resumen/Summary



RESUMEN

Existe una carencia de trabajos dedicados estudiar cambios funcionales en el colon asociados al envejecimiento y sus mecanismos subyacentes. Este estudio pretende:

1.- Caracterizar la influencia de las capas mucosa y submucosa sobre la motilidad colónica, así como el efecto del envejecimiento y el tratamiento con melatonina sobre sus patrones motores.

2.- Estudiar los cambios por envejecimiento en marcadores de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis al igual que cambios en el estado de la mitocondria y su producción energética.

3.- Determinar si el Parkinson presenta síntomas digestivos en estadíos tempranos que puedan servir de biomarcadores para un diagnóstico precoz.

4.- Conocer los cambios en la polarización y propagación citoplasmática de la señal de calcio en el páncreas envejecido.

Los resultados de la presente tesis permiten concluir que:

1.- Mucosa y submucosa deben ser consideradas como elementos activos en la motilidad colónica. El envejecimiento genera una pérdida de contractilidad miógena, alteraciones en la respuesta neurógena y en la señalización de calcio y también sobreexpresión de mTOR, ocasionando cambios en la velocidad y progresión de las ondas peristálticas. El tratamiento con melatonina palía algunos de estos cambios.

2.- La melatonina actúa reduciendo los marcadores de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis, a la vez que mejora la función mitocondrial.

3.- El modelo animal de Parkinson estudiado no desarrolla alteraciones colónicas que puedan ser usadas como biomarcador.

4.- El envejecimiento altera la señal de calcio polarizada en células acinares mediante cambios en la función mitocondrial y modificaciones de los depósitos acídicos y los receptores de rianodina.

SUMMARY

Evidence for aging-induced functional changes in colon and the mechanisms underlying those changes is lacking. This study is aimed:

1.- To characterize the role of mucosal and submucosal layers on the control of colonic motility and the effects of aging and melatonin treatment in colonic motor patterns.

2.- To study age-related changes in markers of oxidative stress, inflammation and apoptosis, and alterations of mitochondria status and its role as energetic support.

3.- To determine whether neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease develops early colonic dysfunctions that could be used as biomarkers for early diagnostic.

4.- To know age-associated changes in the polarization of intracellular calcium signalling and its propagation as calcium wave in the pancreas.

The results of this thesis allow us to conclude that:

1.- Mucosa and submucosa layers should be considered as players in the control of colonic motility. Aging is associated to a decrease in myogenic and subtle alterations in neurogenic contractions, alterations of Ca^{2+} signalling and m-Tor over-expression that translates into changes on the speed and progression of the peristaltic waves. Melatonin treatment ameliorates these age-related changes.

2.- Melatonin effects are related to the normalizations of markers for oxidative stress, inflammation and apoptosis and improves mitochondria function.

3.- The animal model of Parkinson's disease does not develop any colonic dysfunction that could be used as biomarker.

4.- Aging alters the polarized Ca^{2+} signal in pancreatic acini due to changes in mitochondria function and modifications of acidic Ca^{2+} stores and ryanodine receptors

Trabajo subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación a cargo del proyecto:
BFU-2007-60563

Francisco Eduardo Martín Cano ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación para la realización de la tesis doctoral en el departamento de Fisiología de la Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional de Cáceres, de la Universidad de Extremadura. Referencia: BES-2008--002749

Cuando lo creas todo perdido, no olvides que aún te queda el futuro, tu cerebro, tu voluntad y dos manos para cambiar tu destino. (*Wernher von Braun*)

A lo largo de estos años de trabajo muchos han sido los momentos que merecen ser recordados y muchas las personas que han aportado una gran parte de lo que en esta tesis se refleja. Es mi deseo expresar a todos y cada uno de ellos mi más profunda gratitud:

Gracias a mis directores, María José Pozo Andrada y Pedro Javier Camello Almaraz. Su dedicación y capacidad formativa han hecho posible esta tesis doctoral. Quiero agradecerles todos los conocimientos que han compartido conmigo y su inestimable guía en este proceso. A *Che* tengo que agradecerle infinidad de cosas, sería aburrido reflejar aquí todas y cada una de ellas, por eso me quedo con aquello que por encima de todo valoro más: LA CONFIANZA. Se que especialmente en este último periodo ésta ha podido verse por momentos defraudada, lo siento, pero también es de agradecer la comprensión demostrada en esos trances. A Pedro le agradezco en especial la gran cantidad de conocimientos que me ha dejado, y sobre todo, la claridad y sencillez con la que los transmite. GRACIAS.

También dar las gracias a mis compañeros de departamento: a Cristina por esas palabras de ánimo que siempre tiene disponibles y esa capacidad de ver un “poquito” más allá cuando no anda uno del todo bien. A Fátima simplemente por haber hecho la mitad de esta tesis y aguantar mis quejas sobre la otra mitad, gracias de veras. A Puri, por seguir aguantando el embite diario de mis buenos días. También a todos los que habéis pasado por el departamento, July, David, Sole, Nacho, Patri todos habéis aportado mucho más de lo que imagináis, Gracias.

Mil gracias también a mi familia, por la infinita paciencia y comprensión demostrada durante estos años. Sois un apoyo fundamental sin el cual sería imposible afrontar empresas como ésta.

Qué decir también de mis amigos, sin su apoyo en los baches nada de esto habría salido adelante. Gracias a Antolín, nuestra andadura común ha supuesto una enorme complicidad, una comprensión directa de lo que el otro está pasando. No te equivoques, la romana no está equilibrada, tú le has echado más. Gracias también a María por hacerme ver las cosas con claridad y por su espíritu crítico. Gracias a Esther, por haber sido tan valiente de decirme que soy un cobarde. Y bueno, gracias a todos, de verdad, a Javi, Juanma, Irene, Antonio... Gracias por haber estado ahí

Mar, muchas gracias por todo, tu apoyo ha sido fundamental en muchos momentos de estos años. Acabas donde acabes, te deseo lo mejor.

Gracias también a los miembros del departamento de fisiología de la Universidad de Nevada y al departamento TARGID de la Universidad Católica de Lovaina, por

haberme aceptado en sus grupos de trabajo, enriqueciendo enormemente mi formación científica. Thanks a lot / Dank je wel.

Gracias también a los miembros del departamento de bioquímica de la facultad de enfermería de la UEX, al departamento de fisiología de la facultad de veterinaria de la UEX, al personal de la escuela de enfermería de la UEX, al departamento de fisiología de la facultad de medicina de la universidad completunse de Madrid. Gracias por haberme asesorado y facilitado sus instalaciones, ampliando desinteresadamente la diemensión científica de este proyecto.

Gracias por último a la Universidad de Extremadura, institución, casi segunda casa, que me ha proporcionado instalaciones, servicios, becas y en definitiva ha posibilitado que sea posible la ejecución de esta tesis doctoral.

A todos, simplemente GRACIAS

CONTENIDO

<i>Resumen/Summary</i>	5
<i>Resumen</i>	1
<i>Summary</i>	2
<i>Introducción</i>	15
<i>Fisiología Celular del Músculo Liso y las Células Acinares</i>	17
El Músculo Liso	17
Contracción del Músculo Liso.....	17
<i>El aparato contráctil en el músculo liso.</i>	17
<i>Mecanismo de contracción del músculo liso</i>	18
Homeostasis del Ión Ca ²⁺ en el Músculo Liso.....	19
<i>Depósitos de calcio intracelulares</i>	20
<i>Mantenimiento de la concentración de calcio en reposo</i>	24
<i>Sistemas para la entrada de calcio al citosol.</i>	27
<i>Sensibilización al calcio.</i>	33
Células Pancreáticas Exocrinas	34
Receptores y señalización transmembrana	35
Mensajeros intracelulares	35
<i>Inositol trifosfato (IP₃)</i>	35
<i>Diacilglicerol (DAG)</i>	36
<i>Adenosín mono-fosfato cíclico (AMPc)</i>	36
<i>Movilización de calcio intracelular</i>	36
Mecanismos de acción de los mensajeros intracelulares	40
<i>Proteín cinasa A (PKA)</i>	40
<i>Proteín cinasa C (PKC)</i>	40
<i>Cinasas activadas por Ca²⁺-calmodulina</i>	40
<i>Tirosina cinasas</i>	40
<i>Proteín fosfatasas</i>	41
Exocitosis	41

<i>El Colon</i>	42
Descripción anatómica e histológica.	42
Motilidad colónica.	44
Papel del músculo liso en la motilidad colónica.	45
Células Intersticiales de Cajal y su Importancia en la Motilidad Colónica.....	48
<i>Distribución</i>	49
<i>Función en el tracto gastrointestinal</i>	50
Sistema nervioso entérico en el colon.	52
<i>Estructura del sistema nervioso entérico</i>	53
<i>Tipos neuronales presentes en el sistema nervioso entérico.</i>	53
<i>Inervación simpática y parasimpática en el colon.</i>	56
<i>Vías aferentes extrínsecas.</i>	57
<i>Transmisión nerviosa en el sistema nervioso entérico.</i>	58
Control motor del colon.	59
<i>Regulación intrínseca.</i>	59
<i>Regulación extrínseca</i>	62
Farmacología de la motilidad colónica	63
<i>Acetilcolina</i>	63
<i>Noradrenalina</i>	63
<i>Serotonina</i>	63
<i>Taquikininas</i>	64
<i>Opioides</i>	64
<i>Óxido nítrico</i>	64
<i>El Envejecimiento</i>	65
Teorías del envejecimiento.	66
Teoría de los radicales libres.....	66
Teoría mitocondrial del envejecimiento.....	67
Teoría basada en la longitud de los telómeros.	68
Teoría genética.....	69
Terapias antienvjecimiento	69
Uso de antioxidantes	69

Suplementación hormonal.....	69
Terapias basadas en la restricción calórica.....	70
Envejecimiento y señalización celular.....	72
El envejecimiento del tracto gastrointestinal.....	73
Efectos sobre el sistema nervioso entérico.....	73
Efectos del envejecimiento sobre el músculo liso del tracto gastrointestinal.....	74
Enfermedades relacionadas con el envejecimiento.....	75
<i>La melatonina.....</i>	<i>77</i>
Melatonina: Síntesis y secreción.....	77
Receptores para la melatonina.....	78
Acciones biológicas de la melatonina.....	78
Capacidad antioxidante de la melatonina.....	78
Posibles indicaciones terapéuticas de la melatonina.....	79
Indicaciones terapéuticas de la melatonina en el tracto gastrointestinal.....	79
Melatonina, envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad.....	81
<i>Bibliografía.....</i>	<i>83</i>
<i>Justificación y objetivos.....</i>	<i>127</i>
<i>Material y métodos.....</i>	<i>131</i>
<i>Trabajos experimentales.....</i>	<i>135</i>
MELATONIN INCREASES SPONTANEOUS COLONIC CONTRACTIONS AND PERISTALSIS IN OLD MICE: THE ROLE OF THE MUCOSA.....	137
CHARACTERIZATION OF THE MOTOR INHIBITORY ROLE OF COLONIC MUCOSA UNDER STIMULATION.....	155
AGING IN THE MOUSE COLON. IMPORTANCE OF THE NEURAL INFLUENCE FROM SUBMUCOSAL PLEXUS.....	167
MELATONIN, AND TO A LESSER EXTENT GROWTH HORMONE, RESTORES COLONIC SMOOTH MUSCLE PHYSIOLOGY IN OLD RATS.....	183
MITOCHONDRIAL DEPOLARIZATION AND METABOLIC SHIFT ASSOCIATED TO AGE INDUCED IMPAIRMENT OF CONTRACTION IN AGED SMOOTH MUSCLE OF MICE COLON.....	203
mTOR PATHWAY AND Ca ²⁺ STORES MOBILIZATION IN AGED SMOOTH MUSCLE CELLS.....	221

ENTERIC NEURONAL FUNCTION AND COLONIC MOTILITY IN PINK1-/- MICE, A MODEL FOR PARKINSON'S DISEASE..... 235

PROPAGATION OF INTRACELLULAR Ca²⁺ SIGNALS IN AGED EXOCRINE CELLS 249

Discusión general 261

Conclusiones..... 267

Introducción



FISIOLOGÍA CELULAR DEL MÚSCULO LISO Y LAS CÉLULAS ACINARES

EL MÚSCULO LISO

Este tejido muscular está presente en casi todo el lecho vascular, el tracto digestivo, vías aéreas y en el sistema urogenital. En general, el músculo liso genera fuerza y movimientos, aunque no esté anclado en puntos fijos como ocurre en el caso del músculo esquelético sino dispuesto en forma de red o lámina, de manera que la fuerza generada se transmite a lo largo del órgano. Por tanto, sus funciones son: el control de la presión y el volumen del órgano, el mantenimiento de su forma y el transporte del contenido del órgano.

Se diferencia del músculo esquelético en que sus células son más pequeñas (20-60 μm) y mononucleadas, tienen numerosas interconexiones para transmitir la fuerza de contracción (placas de unión) y para comunicar la excitación (gap junction) y su retículo sarcoplásmico se localiza especialmente alrededor de unas invaginaciones de la membrana llamadas caveolas. Tampoco presentan aspecto estriado al microscopio, ya que sus filamentos contráctiles no se disponen tan organizadamente como en el caso del músculo estriado. En el músculo liso, los filamentos contráctiles se anclan a unas zonas denominadas “cuerpos densos”, consiguiendo un acortamiento celular con la contracción.

CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO

Al igual que ocurre en otros tipos musculares, el aumento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático es el principal evento que inicia la contracción muscular lisa. En este apartado se describirá tanto el aparato contráctil presente en el músculo liso como los mecanismos que conducen a la contracción.

El aparato contráctil en el músculo liso.

Existen tres tipos de filamentos implicados en la contracción: filamentos finos compuestos por actina, cuyo diámetro varía entre 5-7nm; filamentos gruesos compuestos de miosina, con 15nm de diámetro; y filamentos intermedios compuestos por desmina y vimentina cuyo diámetro aproximado es de 10nm. Tanto los filamentos de actina como los de miosina forman parte del dominio contráctil de la célula muscular lisa (1). Mientras que los filamentos intermedios pertenecen al dominio citoesquelético (1), que es el encargado de dar forma a las células, organizar el interior celular y transmitir las fuerzas creadas por las interacciones de los filamentos contráctiles (2). En el músculo liso, los filamentos de miosina y de actina no se encuentran ordenados en forma de sarcómera como en el músculo estriado, sino que se unen a unas estructuras electrodensas compuestas por α -actinina denominadas cuerpos densos, encontrándose los filamentos de miosina interdigitados entre los de actina procedentes de dos

cuerpos densos contiguos. Así, las agrupaciones de filamentos contráctiles (actina y miosina) se orientan oblicuamente respecto al eje mayor de la célula.

Los filamentos finos están compuestos por actina (actina G), una proteína globular de 42 KDa, que polimeriza dando lugar a un filamento helicoidal de dos hebras (actina F) (3). En las estrías de la hélice se insertan otro tipo de proteínas de naturaleza inhibitoria (caldesmonina y calponina) que regulan la actividad de la actina (4). Los filamentos finos son polares, poseen un extremo que se inserta en un cuerpo denso mientras que el otro extremo queda libre y rodeado de filamentos gruesos de miosina. (5).

Los filamentos gruesos están formados por moléculas de miosina, proteína de unos 480KDa compuesta por la asociación no covalente de 6 cadenas proteicas, un par de cadenas pesadas y dos pares de cadenas ligeras (MLCs) (6). Las dos cadenas pesadas, de 200KDa cada una, forman una cola helicoidal rígida cuya agregación forma el filamento de miosina, que aparece interdigitado entre filamentos finos de actina. En el extremo contrario a la cola existe una cabeza globular rodeada por dos cadenas ligeras distintas: una cadena ligera de 20KDa denominada cadena ligera reguladora (MLC20) y una cadena de 17KDa o cadena ligera esencial (MLC17). Cada cabeza globular posee un sitio de unión a la actina y capacidad para hidrolizar Mg^{2+} -ATP activada por la unión a la actina. En la parte de las cadenas pesadas que sobresale del filamento de miosina se localizan dos zonas bisagra que permiten la rotación de la cabeza globular con respecto al filamento de miosina (6).

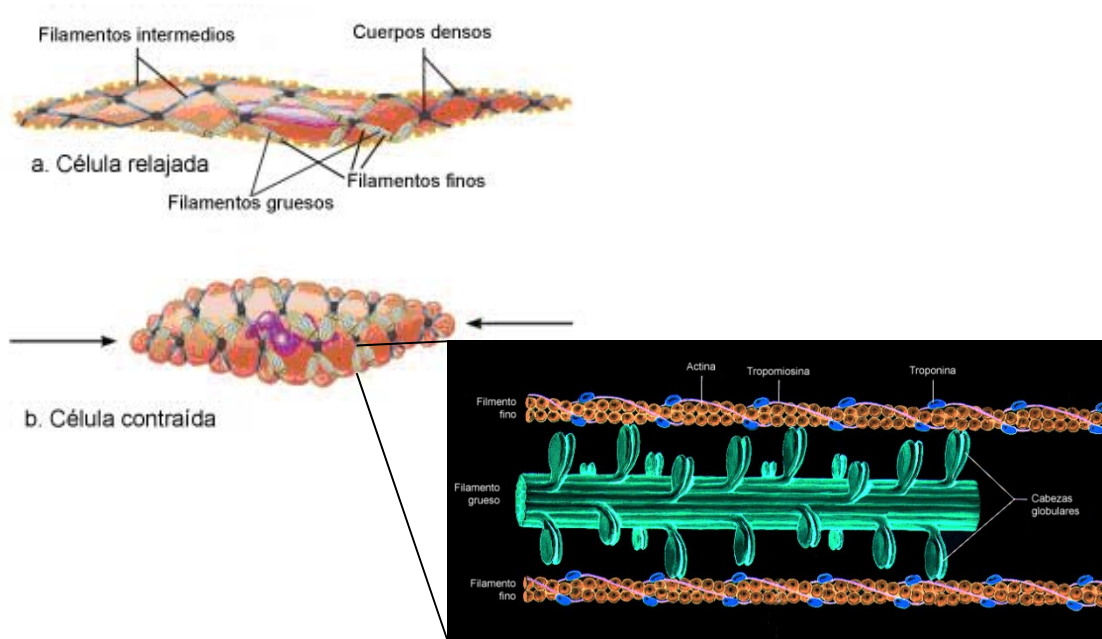
Mecanismo de contracción del músculo liso.

El mecanismo básico para la generación de fuerza consiste en la interacción cíclica entre la actina y la miosina, proceso denominado “ciclo de los puentes cruzados” que permite el deslizamiento de filamentos gruesos y finos y el consiguiente desarrollo de fuerza o acortamiento celular .

En el músculo liso, al aumentar la concentración de calcio intracelular, éste se une a la calmodulina, proteína que une de forma reversible 4 iones Ca^{2+} . Una vez formado el complejo Ca^{2+} -calmodulina, ésta sufre un cambio conformacional y se une a la cinasa de la cadena ligera reguladora de miosina (MLCK). La formación del complejo terciario (Ca^{2+} -Calmodulina-MLCK) conduce a la fosforilación de la cadena MLC20 y provoca un cambio conformacional en la cabeza globular de las moléculas de miosina que aumenta su capacidad de hidrolizar el Mg^{2+} -ATP activada por la presencia de actina (7). Esto desencadena el ciclo de los puentes cruzados y la consiguiente contracción celular. El primero se basa en las diferentes afinidades de las moléculas de miosina por las de actina dependiendo de si tienen unido ATP o ADP (8).

Cuando disminuye la concentración de Ca^{2+} citoplasmático la actividad de la MLCK disminuye, lo que supone el cese del ciclo de los puentes cruzados. Además esto se suele ver reforzado por la activación de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) que provoca la desfosforilación de la MLC20, favoreciendo así la relajación del músculo. Por tanto, en el músculo liso el factor clave en el control de la contracción es el nivel de fosforilación de la

MLC20, directamente regulado por la fosfatasa MLCP y la cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina MLCK.



Representación del mecanismo de contracción celular en el músculo liso. / Ampliación del complejo Actina-Miosina

HOMEOSTASIS DEL IÓN Ca^{2+} EN EL MÚSCULO LISO.

En las células de mamíferos sólo una pequeña fracción del calcio se presenta como Ca^{2+} iónico libre en el citosol, alcanzando una concentración de aproximadamente entre 50-200nM. El resto se encuentra unido a proteínas y moléculas orgánicas citosólicas, a constituyentes de membrana, y especialmente secuestrado en el interior de orgánulos que funcionan como verdaderos depósitos intracelulares de Ca^{2+} (9).

La presencia de tampones de Ca^{2+} en el citosol de la célula hace que la difusión de este ion sea mucho más lenta que la de cualquier segundo mensajero. En este sentido, la entrada de Ca^{2+} que tiene lugar a través de canales situados en la membrana plasmática en respuesta a un estímulo podría ser insuficiente para alcanzar una señal global de Ca^{2+} en todo el citoplasma. De aquí la importancia de la presencia de depósitos de Ca^{2+} capaces de producir una movilización rápida de Ca^{2+} en repuesta a segundos mensajeros de difusión rápida, permitiendo conseguir

incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ más difusos y coordinados y en lugares más lejanos a la membrana plasmática (10).

Depósitos de calcio intracelulares.

Como ya se ha mencionado, el Ca^{2+} se distribuye en compartimentos en el interior celular. El principal depósito lo constituye el retículo endoplásmico (RE), pero además se ha puesto de manifiesto el papel de otros orgánulos, como el complejo de Golgi y los gránulos de secreción (11;12) como depósitos de Ca^{2+} dinámicos. La mitocondria en cambio no acumula Ca^{2+} en condiciones de reposo, pero si es capaz de captar grandes cantidades de Ca^{2+} durante la estimulación celular (13;14).

Retículo endoplásmico.

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo intracelular presente en todos los tipos de células eucariotas. Es probablemente el orgánulo más grande, siendo su membrana un 50% de las membranas de la célula. Tiene un alto grado de plasticidad, lo que le permite tener una organización estructural muy heterogénea y está implicado principalmente en los procesos celulares de señalización y síntesis de proteínas y posterior procesamiento post-traducciona. Normalmente aparece como una estructura reticular, de túbulos interconectados, teniendo un lumen muy denso que contiene numerosos sistemas de enzimas. El RE a menudo adopta una determinada organización con un cierto grado de heterogeneidad, lo cual le permite desarrollar diferentes funciones en diferentes regiones de la célula. Un claro ejemplo de esta heterogeneidad es la división estructural entre RE rugoso y RE liso. El primero debe su nombre a su asociación con ribosomas, hecho que determina que su función principal sea la síntesis de proteínas, aunque también desempeñe un papel en la señalización por Ca^{2+} . El RE liso está principalmente implicado en la señalización por Ca^{2+} en las células de músculo y las neuronas. Concretamente, en el caso de las células musculares, este orgánulo recibe el nombre de retículo sarcoplásmico (RS).

El RE recibe señales de mensajeros intracelulares como el Ca^{2+} , el IP₃, la esfingosina-1-fosfato (S-1-P), especies reactivas de oxígeno y esteroides. En respuesta, el RE genera una serie de señales como la liberación de Ca^{2+} , de ácido araquidónico, activación de canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática (SOC), señales de estrés o varios factores de transcripción (NF- κ B, CHOP, ATF-6 y SREBPs).

Para llevar a cabo la señalización por Ca^{2+} , el RE posee receptores de IP₃ (IP₃R) y receptores de rianodina (RyR), responsables ambos de la liberación de Ca^{2+} en respuesta a estímulos. El rellenado de Ca^{2+} del RE ocurre cuando los canales de liberación de Ca^{2+} están cerrados, y lo llevan a cabo las bombas SERCA (Sarco Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase) (11). En condiciones basales, la $[Ca^{2+}]$ del RE no es estática, existe un equilibrio entre el bombeo de Ca^{2+} al interior del RE por parte de las SERCA y una salida de Ca^{2+} pasiva o "leak". En relación a esta salida se ha propuesto (15) que podría tener lugar a través del traslocón, un complejo de proteínas de la membrana del RE, cuya función principal es la de trasladar las proteínas sintetizadas al interior del RE. La pérdida de Ca^{2+} ocurriría, probablemente, cuando la

cadena polipeptídica es liberada y el ribosoma aún está unido al traslocón. También se ha sugerido que los IP3R podrían estar implicados en este fenómeno (16).

Para transmitir la señal de Ca^{2+} a través de la célula el RE utiliza un proceso regenerativo denominado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ("Ca²⁺ induced Ca²⁺ release" CICR). Este proceso de CICR opera de dos formas. En primer lugar la proximidad entre los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática y los canales de liberación de Ca^{2+} del RE le permite al Ca^{2+} que entra desde el medio extracelular inducir la apertura de los canales de liberación de Ca^{2+} del RE, un fenómeno particularmente importante en células cardíacas y neuronas. Por otra parte, la liberación de Ca^{2+} por CICR juega un papel regenerativo, ya que los canales de liberación de Ca^{2+} están cerca unos de otros para poder establecer las ondas de Ca^{2+} intracelular que transmiten la señal de Ca^{2+} a través de la célula (17). Otra característica importante de la señalización de calcio del RE es que es capaz también de actuar como unidad de señalización. Por ejemplo, en algunos tipos celulares los IP3R o los RyR localizados en una zona particular de la membrana del RE serían capaces de liberar Ca^{2+} independientemente de IP3R o RyR situados en otras zonas adyacentes.

El RE también actúa como tampón de Ca^{2+} . Existen una serie de proteínas de unión al Ca^{2+} (CaBPs), como la calnexina y la calreticulina que participan en la regulación de la actividad de las SERCA (18;19). Éste sería un claro ejemplo de la interacción entre la señalización por Ca^{2+} y la síntesis de proteínas en el RE. Las CaBPs se pueden dividir de acuerdo con la función que desarrollan en tampones y chaperonas. Los tampones, como la calsecuestrina y la calreticulina tienen una gran capacidad de unión al Ca^{2+} , lo que posibilita que la concentración de Ca^{2+} en el interior del lumen sea de 5-10mM mientras que la concentración de Ca^{2+} libre está estimada entre 100-700 μM (20-26). Esto permite al RE generar gran número de señales de Ca^{2+} con amplitud constante sin tener que depender del lento mecanismo de bombeo de Ca^{2+} al lumen. El mantenimiento de una concentración de Ca^{2+} luminal ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$) constante también es importante en el procesamiento post transcripcional, plegamiento y exportación de proteínas (27-29). Estos procesos los llevan a cabo chaperonas sensibles al Ca^{2+} como la GRP78 (BiP), GRP94 (endoplasmína) y la calnexina. Una disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ produciría una acumulación de proteínas mal plegadas y la activación de vías de señalización de estrés en el RE. Además, existen una serie de proteínas auxiliares (FKB, sorcina, triadina, fosfolambano) que contribuyen al sistema de señalización por Ca^{2+} del RE (30). Algunas, como la triadina y la sorcina, actúan anclando la calsecuestina a los RyR en células cardíacas, otras, como el fosfolambano, inhiben la bomba SERCA.

El RE también contribuye a la señal de Ca^{2+} que controla procesos como la excitabilidad neuronal, la exocitosis en el terminal pre-sináptico, la plasticidad sináptica y la apoptosis. Por ejemplo, la apoptosis se activa cuando la depleción de Ca^{2+} del RE causa una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, una situación que induce la activación de dos repuestas a estrés altamente conservadas: la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) y la respuesta de sobrecarga del RE (EOR). Para evitar la depleción de Ca^{2+} y la consecuente activación de las vías de señalización de estrés del RE, la célula posee mecanismos de entrada de Ca^{2+} operados por depósitos, la denominada entrada capacitativa de Ca^{2+} (CCE). La función

principal de este mecanismo es mantener el nivel de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares (31). La entrada capacitativa de Ca^{2+} también puede participar en la señalización por Ca^{2+} , especialmente bajo condiciones donde la señal de Ca^{2+} debe mantenerse durante un periodo de tiempo prolongado, como ocurre durante la proliferación celular (32).

Mitocondria.

La mitocondria constituye el principal lugar de generación de energía para la célula. Es un orgánulo de pequeño tamaño con un funcionamiento parcialmente independiente al resto de la célula, ya que posee ADN propio y tiene ritmos de replicación y síntesis de algunas proteínas propios.

La mitocondria tiene un papel regulador en la concentración de calcio en muchos tipos de células, incluyendo el músculo liso. La localización estratégica de las mitocondrias cerca de los lugares donde se producen las cascadas intracelulares de entrada y salida de calcio, hace que estos orgánulos estén presentes en microdominios con alta $[\text{Ca}^{2+}]$, permitiéndoles acumular el ion incluso cuando tienen lugar pequeños aumentos de concentración global de calcio (33).

En la membrana interna de dicho orgánulo se producen potenciales de membrana muy negativos debidos a la extrusión de protones hacia el espacio intermembrana procedentes de la cadena de transporte de electrones. Esto produce un gradiente electroquímico muy fuerte que favorece la entrada de calcio a la luz mitocondrial. El influjo de calcio a la mitocondria se produce a través de un transportador selectivo uniporter de Ca^{2+} localizado en la membrana interna de la mitocondria (34). La naturaleza exacta del canal se puso de manifiesto en un trabajo realizado por Kirichok y cols. en el que demuestran con la técnica de patch-clamp que el uniporter es, en realidad, un canal (35).

La mitocondria mantiene su concentración intraluminal de calcio gracias a la expresión de antiporters electroneutrales que extraen calcio muy lentamente cambiándolo por H^+ o Na^+ . Además la salida de Ca^{2+} también se produce por una CICR mitocondrial mediante activación transitoria, reversible y rápida, del poro de transición mitocondrial sensible a Ca^{2+} (36).

La proximidad que existe entre el RS y la mitocondria favorece la cooperación entre estos dos orgánulos en el mantenimiento de la homeostasis y la señalización del calcio. Está demostrado que las señales de calcio citosólicas procedentes de la activación de los RyR o IP3R se transmiten a la mitocondria. Además, el contenido de Ca^{2+} mitocondrial se eleva cuando la célula se expone al estímulo de agonistas que movilizan calcio. En realidad, la aportación del calcio procedente de la mitocondria, parece modular el patrón espacio-temporal de las respuestas debidas a IP3 y la forma de las mismas. Aproximadamente la mitocondria es capaz de acumular entre 25-50% del calcio liberado desde RyR o IP3R (37).

Aparato de Golgi.

El aparato de Golgi está implicado en el procesamiento y distribución de proteínas de secreción y de membrana. Participa junto con el RE en la señalización por Ca^{2+} durante la

estimulación celular, aunque sus cinéticas de liberación de Ca^{2+} se ha visto que son diferentes (38). La función del complejo de Golgi está regulada, en parte, por cambios en la concentración de Ca^{2+} , tanto en el lumen como en el citosol adyacente al orgánulo (39;40). Se ha descrito que el complejo de Golgi puede llegar a almacenar hasta un 5% del Ca^{2+} total de la célula (41). La concentración de calcio libre en el complejo de Golgi es del orden de 0.3mM en reposo(42;43), por lo que el gradiente de Ca^{2+} entre el lumen del complejo de Golgi y el citosol es considerable.

La captación de calcio en este orgánulo es llevada a cabo por dos grupos de bombas: las SERCA (44-46) y las SPCA (Secretory Pathway Ca^{2+} ATPase) (43;46). Las SPCA además bombean Mn^{2+} al lumen del complejo, el cual es requerido para varias reacciones enzimáticas que se llevan a cabo en dicho compartimento. La distribución de estas bombas está muy definida, las bombas SERCA se localizan principalmente en la cara cis del complejo de Golgi, mientras que las SPCA se localizan principalmente en la cara trans (47). Además, el aparato de Golgi contiene proteínas de unión al calcio como CALNUC (44;48), Cab 45 (49) y P54/NEFA (50).

El aparato de Golgi comparte con el RE la capacidad de liberación rápida de Ca^{2+} inducida por IP3 (42;51), aunque en células HeLa se ha descrito que la liberación de Ca^{2+} del complejo de Golgi se inactiva más rápidamente que la del RE (38). En conjunto este orgánulo posee la maquinaria necesaria para comportarse como un depósito de Ca^{2+} dinámico.

Vesículas secretoras.

El tráfico de vesículas es un mecanismo muy conservado dentro de los diferentes organismos eucariotas (42;52). Una de las propiedades mejor conservada en la secreción es la señalización por Ca^{2+} . Se ha descrito en mamíferos, que las vesículas de secreción participan en la señal de Ca^{2+} y en la modulación de las oscilaciones citosólicas de Ca^{2+} (53-55). Algunos autores han demostrado que los gránulos de secreción pueden liberar Ca^{2+} al citosol de manera periódica y pueden aumentar la concentración de Ca^{2+} de manera efectiva hasta los niveles necesarios para la activación de proteínas de fusión dependientes de Ca^{2+} , implicadas en la secreción. (56;56;57) que sólo están presentes en estos lugares específicos (52;58;59).

Mantenimiento de la concentración de calcio en reposo.

El mantenimiento de la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) es uno de los mecanismos fundamentales de señalización celular (60;61). En estado de reposo, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es del orden de 100nM. Esta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es mantenida por sistemas de bombeo de Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática y en las membranas de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares. Estos sistemas, además, ayudan a la célula a recuperar los niveles de calcio basales tras la estimulación celular. Los principales mecanismos responsables de retirar el Ca^{2+} del citosol son las ATPasas tipo P transportadoras de Ca^{2+} SERCA, PMCA Y SPCA, sistemas de transporte de Ca^{2+} en contra de gradiente que consumen ATP, y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCE) de la membrana plasmática. Estos sistemas aumentan su actividad siempre y cuando aumente $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y recuperan su ritmo basal en cuanto se recupera la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal. (62-65). Teniendo en cuenta lo anterior, podemos agrupar estos sistemas en dos procesos más concretos en función del lugar hacia el que transportan el Ca^{2+} : extrusión de Ca^{2+} y recaptación de Ca^{2+} hacia los depósitos.

Extrusión de calcio.

Los sistemas responsables de este fenómeno son la PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La velocidad de descenso de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} hasta niveles basales depende de la concentración alcanzada, siendo mayor después de un aumento prolongado de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} . No obstante, el proceso es aparentemente saturable (66). De estos mecanismos, el más importante cuantitativamente varía dependiendo del tejido estudiado, aunque en el caso del músculo detrusor parece ser más importante el intercambiador.

PMCA Plasma Membrane Calcium ATPase

La bomba PMCA es una cadena polipeptídica de 138 kDa (67). Su funcionamiento es eléctricamente neutro porque el Ca^{2+} bombeado al espacio extracelular es intercambiado por dos H^+ , que son expulsados al exterior por intercambiadores H^+/Na^+ de la membrana plasmática. En el músculo liso la PMCA se activa por calmodulina y por fosforilaciones, que eliminan su autoinhibición e incrementan la afinidad de la PMCA por el Ca^{2+} y la velocidad de extrusión de éste (68). El potencial de membrana también modula la actividad de la bomba PMCA, de tal forma que la despolarización de membrana del músculo liso estimula a la bomba PMCA y

acelera la salida Ca^{2+} , mientras que la hiperpolarización de membrana la inhibe (69). Como inhibidores, también se han descrito MgCl_2 , ortovanadato, caloxin 2A1, 5-(6)-carboxienosina (CE) y lantano.

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

La extrusión de Ca^{2+} por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ utiliza la energía del gradiente electroquímico de Na^+ y parece seguir una estequiometría $3 \text{Na}^+ / 1 \text{Ca}^{2+}$. Pero el sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, no es un sistema unidireccional, sino que puede mover Ca^{2+} en ambas direcciones dependiendo del gradiente transmembrana para el Na^+ . Así, el aumento del Na^+ intracelular o la disminución de Na^+ en el medio extracelular aumenta la entrada de Ca^{2+} en la célula, todo lo contrario al proceso de extrusión detallado anteriormente. De hecho, en el músculo liso detrusor, en el que este sistema parece ser predominante (70), se ha postulado que el intercambiador puede ser tanto un sistema de extrusión como una vía de entrada en función de los cambios de la concentración intracelular de Na^+ al excitarse la célula muscular (71). Existe mucha controversia sobre la contribución relativa del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en el músculo liso.

Recaptación de calcio hacia los depósitos.

La entrada de Ca^{2+} dentro de los orgánulos tiene lugar en contra de gradiente de concentración por lo que requiere energía para producirse. En el caso del retículo sarcoplásmico, la energía es proporcionada por la ATPasa denominada SERCA, mientras que en la mitocondria, la fuerza conductora es aportada por el potencial de membrana fruto de la cadena respiratoria, negativo en el interior. La vía secretora lleva a cabo la recaptación a través de la SPCA

SERCA Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase.

La SERCA es una proteína transmembrana de un tamaño aproximado de 110kDa y está inhibida por dos pequeñas proteínas transmembranales denominadas fosfolambano y sarcolipina. Además puede ser inhibida específicamente por tapsigargina (Tps) o por ácido ciclopiazónico (CPA), lo que experimentalmente ha supuesto una buena herramienta farmacológica para poner de manifiesto el papel tan importante que desempeñan estas bombas y los depósitos que las albergan (72). La curcumina y la 2,5-di-tert-butilhidroquinona (BHQ) también provocan inhibición de esta bomba, estabilizando la SERCA en su conformación de baja afinidad por el Ca^{2+} .

En algunos tipos de músculo liso se ha descrito la coexistencia de dos vías diferentes para el llenado del retículo sarcoplásmico. Así, en arterias mesentéricas existe un depósito que es rellenado por una bomba de Ca^{2+} con actividad ATPasa y otra vía que no necesita de la bomba de Ca^{2+} . Esta última vía de llenado es bloqueada por nifedipina, un bloqueante del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje, y aumentada por Bay K 8644, un activador de ese canal, por lo que se ha postulado que dicho depósito estaría unido a la membrana plasmática por una conexión sensible a voltaje que contribuiría al llenado del depósito de forma independiente a las bombas de Ca^{2+} del tipo SERCA (73).

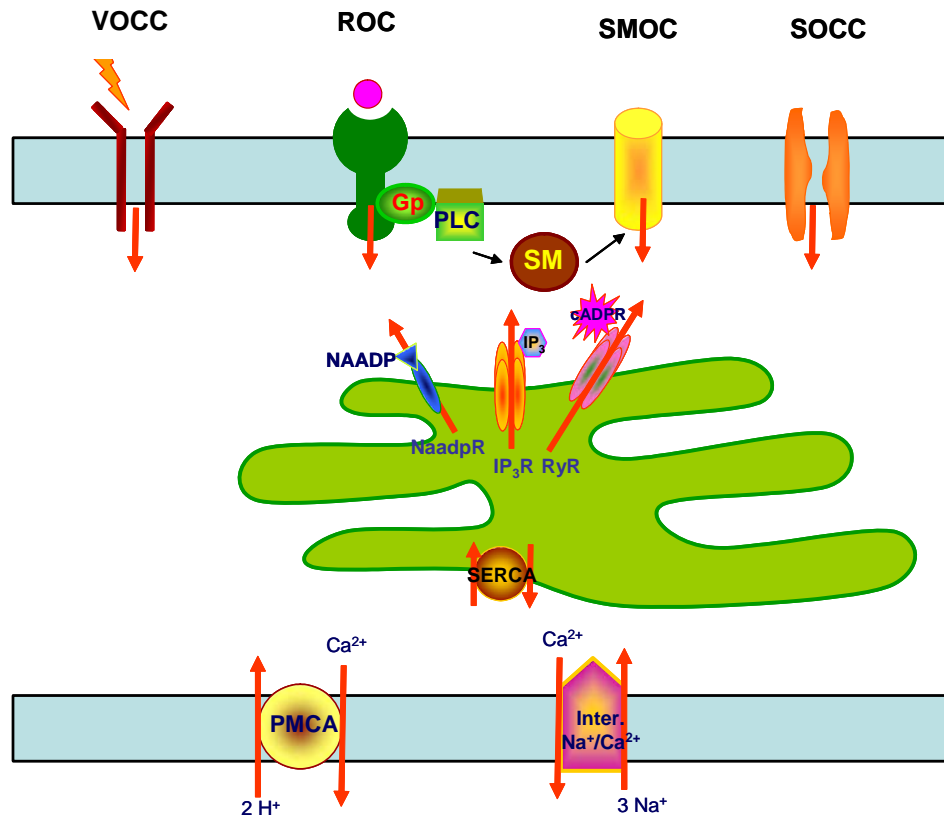
SPCA Secretory Pathway Calcium ATPase.

En cuanto a la SPCA cabe mencionar que es también una proteína transmembrana de peso molecular similar a la SERCA (104 kDa), pero su ubicación se restringe a la cara trans del aparato de Golgi o las vesículas de secreción. La regulación de su actividad no está totalmente determinada.

Mitocondria

Desde los años 50 se sabe que las mitocondrias acumulan grandes cantidades de Ca^{2+} gracias a la presencia en la membrana interna mitocondrial de un transportador de Ca^{2+} unidireccional. Este transporte utiliza como energía el gradiente eléctrico negativo de la membrana interna mitocondrial debido al bombeo de protones hacia el citosol por la cadena de transporte de electrones, de modo que, por ejemplo, la utilización de CCCP, un protonóforo que colapsa este gradiente, aumenta la concentración citoplasmática de Ca^{2+} en miocitos vasculares (74). Recientemente se ha revisado la participación de la mitocondria en la homeostasis del Ca^{2+} (75) y se han determinado los mecanismos implicados en la dinámica del Ca^{2+} mitocondrial: el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial, el intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

Por último, se ha descrito que la entrada de Ca^{2+} a de la mitocondria podría ser más importante cuando las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} son mayores, mientras que el paso al retículo sarcoplásmico, vía SERCA, es más importante cuando los niveles de Ca^{2+} citoplasmático son más bajos (76).



Mecanismos homeostáticos del calcio en el músculo liso

Sistemas para la entrada de calcio al citosol.

Existen multitud de señales de Ca²⁺ diferentes, unas necesitan aumentos rápidos en la [Ca²⁺]_i como la señal sináptica, y otras que requieren la movilización de grandes cantidades de este ión, como ocurre en la contracción muscular. Cada tipo celular expresa distintas combinaciones de canales, de ATPasas y de intercambiadores, lo que hace posible modelar señales de Ca²⁺ particulares y en los diferentes contextos fisiológicos.

En las células musculares lisas la entrada de Ca²⁺ desde el medio extracelular se produce durante los periodos de despolarización de la membrana, distorsiones mecánicas o mediante la estimulación por agonistas a través de distintos tipos de canales tanto específicos como inespecíficos.

Canales de calcio de la membrana plasmática.

En la membrana plasmática coexisten una variedad de canales permeables a Ca^{2+} . Los principales son los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCC), que se encuentran en las células excitables como neuronas y células musculares; los canales operados por receptor (ROC), que se abren rápidamente una vez se ha unido un ligando externo, y también predominan en células excitables; los canales de calcio operados por segundos mensajeros (SMOC), los canales operados por depósito (SOCC) y, por último canales sensibles a estiramiento.

VOCC Voltage-Operated Calcium Channels

Estos canales selectivos para el ion Ca^{2+} son esenciales en muchas funciones celulares como sistemas de excitación-contracción, liberación de neurotransmisores, secreción de hormonas y expresión genética.

La mayor parte del Ca^{2+} que activa el aparato contráctil en las células musculares lisas penetra desde el medio extracelular a través de canales VOCC durante la fase de despolarización del potencial de acción. Estos canales sufren inactivación por despolarizaciones mantenidas o de gran magnitud y por elevaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que a su vez es dependiente de voltaje (77). Los VOCC más importantes en el detrusor son los de tipo L, muy selectivos para el Ca^{2+} (especificidad que se pierde en ausencia de iones divalentes) (78). Estos canales poseen un alto umbral de activación y una alta conductancia y las corrientes a través de ellos son prolongadas ya que su inactivación es lenta. Otra característica de los canales de tipo L es su sensibilidad a las dihidropiridinas (nifedipina), fenilalkilaminas (verapamilo) y benzodiazepinas (diltazem) (79;80) En el detrusor también se han descrito canales VOCC de tipo T cuya apertura e inactivación se produce a potenciales más electronegativos. Su presencia parece estar asociada con la transmisión de potenciales de acción y una actividad de marcapasos (81).

En cuanto a su regulación, la actividad de los canales tipo L presentes en el músculo liso está modulada por un gran número de proteínas, entre ellas: proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG), proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), proteína cinasa C (PKC), subunidades de la proteína G, proteínas tirosinas cinasas (TK) y la cinasa dependiente de Ca^{2+} -Calmodulina tipo II (CaMKII). Además de estas proteínas, otros factores intracelulares que determinan su actividad son el oxígeno, ATP, Mg^{2+} , pH y el propio ion Ca^{2+} (82).

ROC Receptor-Operated Channels

En este tipo de canales, receptor y canal están asociados formando una entidad molecular única o dos adyacentes. La unión del ligando a su correspondiente receptor induciría cambios conformacionales internos que llevarían a la apertura del canal iónico.

Este mecanismo fue descubierto en 1968 por Somlyo y Somlyo (83) como el primer mecanismo conocido distinto de la despolarización de la membrana para la entrada de Ca^{2+} . Desde entonces se ha avanzado mucho en el conocimiento de su función y estructura. En el músculo liso son muchos los neurotransmisores y hormonas los que activan conductancias

catiónicas no selectivas directamente tras unirse a un receptor de membrana. Uno de estos ligandos es la ACh, que actúa a través de receptores muscarínicos activando una corriente catiónica denominada IACH (84). Esta corriente es activada tras la unión de la ACh a receptores de tipo 2 (M2) unidos a proteínas Gi/G0 y modulados por receptores M3 acoplados a fosfolipasa C (PLC), lo que conduce a la formación de IP3 y la consiguiente liberación de Ca^{2+} (85). La conductancia de la IACH parece ser de 20-30 pS (86) y está bloqueada por sustancias como el Gd^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{3+} , quinina y fenamatos.

El neurotransmisor ATP ejerce actividad excitadora o inhibitoria dependiendo del tipo de músculo liso sobre el que actúe. Como transmisor excitatorio, el ATP se une a ROCs, llamados P2X que están expresados en células musculares lisas (87;88). En arteria de oído, vías aferentes y vena safena, la aplicación externa de ATP produce una rápida y transitoria despolarización de la membrana de las células musculares lisas como consecuencia de la activación de una corriente catiónica no selectiva asociada a un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular que es mediado por receptores P2X (89).

Además del ATP y la ACh, se ha comprobado que la liberación de Ca^{2+} desde depósitos mediada por IP3 y la entrada de Ca^{2+} a través de los VOCC incrementa la corriente que tiene lugar a través de los ROC (90). Otras vías de señalización intracelular que incrementan dicha corriente son: Ca^{2+} /Calmodulina (91), cinasa de la cadena ligera de miosina (92) y las tirosinas cinasas (93). En vena porta de la rata la PKC activa esta corriente catiónica (94), aunque también ha sido descrito un papel inhibitorio de esta cinasa en células de músculo liso gástrico (95).

SMOC Second Messenger-Operated Channels

La activación de estos canales está supeditada a la producción de un segundo mensajero desde el interior celular. Comparten muchas propiedades con los ROC, pero la principal diferencia entre ellos es que los SMOC se abren desde el lado citosólico intracelular por proteínas G o segundos mensajeros secundarios a la estimulación del receptor. Estos canales fueron descubiertos en neuronas olfatorias y células fotorreceptoras, en donde segundos mensajeros como los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc, activaban canales iónicos (96).

En cuanto a los segundos mensajeros encargados de la activación de estos canales, cabe mencionar la propia concentración de Ca^{2+} intracelular, las proteínas cinasas y los inosítoles fosfato (97). Por otra parte se sabe que en algunos tipos celulares el inositol 1,3,4,5-tetrafosfato (IP4) puede estar también implicado en la entrada de Ca^{2+} . Aunque el IP4 no es capaz de activar la entrada de Ca^{2+} por sí mismo, puede aumentar la entrada de Ca^{2+} junto con otros factores (98;99).

SOCC Store-Operated Calcium Channels

En algunos tipos celulares, incluido el músculo liso (100) el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares activa una vía de entrada de Ca^{2+} , proceso denominado entrada de Ca^{2+} operada por depósito o entrada capacitativa de Ca^{2+} (CCE) y postulado por primera vez por Putney en 1986 en células no excitables. La comunicación entre los depósitos y los canales

responsables de dicha entrada no está clara, habiéndose sugerido desde comunicación directa entre el receptor del depósito con el canal de la membrana citoplasmática (101) hasta la existencia de mensajeros difusibles (102). En este sentido se han postulado varios modelos para explicar la comunicación depósito-membrana plasmática (103;104). Aunque la CCE es un mecanismo que tradicionalmente ha sido descrito en células no excitables, recientemente miembros de nuestro laboratorio han descrito la presencia de CCE en la vesícula biliar de cobaya y que ésta entrada se asocia a la contracción del músculo (105). La participación del citoesqueleto de actina en este proceso, la regulación de dicha entrada por AMPc y la dependencia de la expresión de los canales TRPCs (posibles candidatos a ser los canales capacitativos) de los niveles citosólicos de Ca^{2+} , se han descrito en el músculo liso de la vesícula biliar por miembros de nuestro grupo de investigación (106-108).

Canales catiónicos no selectivos sensibles al estiramiento

El estiramiento mecánico del músculo liso también puede activar canales iónicos permeables a cationes. Por ejemplo, en células de vejiga urinaria y arterias mesentéricas, el estiramiento de las células induce una corriente de entrada sensible a Gd^{3+} , lo que sugiere la activación de canales catiónicos no selectivos (109;110;110). La selectividad que presentan estos canales por los distintos cationes es la siguiente: $\text{K}^+ > \text{Na}^+ \geq \text{Cs}^+ \geq \text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$.

Según Kuriyama y colaboradores (1995), el estiramiento celular causa un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular que puede ser alcanzado bien por la liberación de Ca^{2+} desde depósitos, por la entrada de Ca^{2+} a través de canales sensibles al estiramiento, o por la entrada de Na^+ también a través de estos canales. Esta entrada de Na^+ produciría una despolarización en la membrana y la consecuente activación de los VOCC (111).

Canales de calcio de los depósitos intracelulares.

Como ya se ha expuesto con anterioridad en el presente trabajo, gran parte del Ca^{2+} intracelular está contenido dentro de orgánulos citoplasmáticos que actúan como depósitos intracelulares de Ca^{2+} . El almacenamiento del Ca^{2+} dentro de estos depósitos desempeña dos importantes funciones: por un lado, constituye un mecanismo de regulación para el ión Ca^{2+} y, además, proporciona un potencial de liberación de Ca^{2+} durante señales fisiológicas. Los principales canales que liberan Ca^{2+} desde los depósitos son el receptor de rianodina (RyR) y el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) (112). También existe una vía insensible a IP3 y RY, la del receptor sensible al ácido nicotínico adenín difosfato (NAADP) (113).

RyR Receptor de Rianodina

El RyR se localiza en la membrana del RE y se encarga de mediar en la liberación de Ca^{2+} responsable de funciones celulares como la contracción muscular y la liberación de neurotransmisores. Su estructura consiste en un homotetrámero de aproximadamente 2,2 MDa (114-116) formado por cuatro subunidades de aproximadamente 565 KDa.

El nombre de este receptor se debe a la rianodina, un alcaloide de origen vegetal, capaz de liberar Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares cuando se une dicho receptor. En condiciones fisiológicas, donde la rianodina no está presente, existen dos ligandos endógenos para este receptor: el propio Ca^{2+} y la ADPribosa cíclica. El efecto estimulante del Ca^{2+} citosólico sobre su propia liberación explicó inicialmente el proceso de CICR, aunque como se verá en el siguiente apartado este proceso también puede incluir receptores de IP3. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ necesaria para activar la apertura es relativamente elevada (cerca al nivel micromolar), aunque en miocitos de detrusor se ha comprobado que la entrada de Ca^{2+} a través de canales sensibles a DHP, puede activar el fenómeno de CICR (117) por la aparición transitoria de microdominios de alto $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la cercanía de los RyR (118). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ también puede provocar una disminución en la probabilidad de apertura de este canal, fenómeno que se produce para $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del orden de 1 mM (existen otros subtipos de RyR que se inhiben a concentraciones de 2-10mM) (119).

Otro agonista endógeno de los RyR es la ADP-ribosa cíclica (ADPRc). Este compuesto es un derivado del NAD presente en el músculo liso. Su acción sobre el receptor de rianodina es compleja y requiere proteínas accesorias y la calmodulina como cofactor (120). Mediante estudios de reconstitución, farmacológicos y funcionales se ha comprobado que las características del canal sensible a ADPRc son similares a las del canal de rianodina (121).

Además de a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y ADPribosa cíclica, los RyR son sensibles a otros agentes fisiológicos (ATP y Mg^{2+}), agentes farmacológicos (rianodina, rojo de rutenio y cafeína), varios procesos celulares (oxidación, fosforilación) y ciertas proteínas (calmodulina, calsequestrina y FKBP12) (122).

Los canales de rianodina median en las células musculares lisas, un tipo de liberación de Ca^{2+} denominado spark a través del cual el Ca^{2+} puede inhibir la contracción muscular. Un spark de Ca^{2+} consiste en una elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transitoria, intensa y localizada en una pequeña zona del citosol adyacente a los depósitos. A diferencia de los sparks del músculo cardíaco, que colaboran en la contracción (123), en el músculo liso la disposición de los depósitos que los originan permite que los sparks activen canales de membrana hiperpolarizantes que contribuyen a la inhibición de la contracción (124). Así, se ha comprobado en diferentes tipos de músculos lisos, incluyendo el músculo detrusor y el de la vesícula biliar, que los sparks están asociados a corrientes de potasio transitorias espontáneas (denominadas STOCs) producidas por la activación de canales de tipo BK, que generan hiperpolarización celular (124-126). Además en el detrusor se ha descrito la presencia de “unidades liberadoras de calcio” compuestas por receptores de rianodina localizados cercanos al plasmalema, donde contactan con los receptores de tipo BK (118).

Mientras que los sparks son bloqueados por la rianodina (que en función de la concentración utilizada inhibe el RyR o lo activa, vaciando el depósito), existen incrementos transitorios rápidos en la concentración citoplasmática de Ca^{2+} que no son bloqueados por rianodina pero sí por xestospongina C, un bloqueante de los receptores de IP3, lo que indica que se deben al receptor de IP3. En el músculo liso de colon se han denominado “puffs” para diferenciarlos de los sparks asociados al RyR. Una diferencia existente entre los puffs y los

sparks es que los primeros activan también los canales de K^+ de tipo SK (127). No se ha descrito la presencia de este tipo de eventos (puffs) en células musculares del detrusor. Los puffs de Ca^{2+} pueden ser importantes en el acoplamiento entre los receptores acoplados a proteínas G y la activación de canales iónicos dependientes de Ca^{2+} presentes en la membrana plasmática.

IP3R Receptor de Inositol 1,4,5-trifosfato

En el músculo liso, al igual que en otros tipos celulares, una variedad de agonistas se unen a receptores acoplados a proteínas G que activan la fosfolipasa C, que a partir de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato genera IP3. Este IP3 se une a su receptor situado en el retículo sarcoplásmico, provocando la liberación de Ca^{2+} desde dicho depósito (112). Esta liberación está modulada por la concentración de Ca^{2+} tanto del lumen del retículo como del citoplasma celular. Así, se ha descrito que el Ca^{2+} luminal controla el receptor de IP3 en hepatocitos de rata y en células musculares lisas (128), ya que es necesaria mayor cantidad de IP3 para vaciar los depósitos que tienen menor contenido en Ca^{2+} que aquellos que están más llenos. El Ca^{2+} citoplasmático tiene dos efectos distintos sobre el receptor de IP3 dependiendo de la concentración del ión y del subtipo de receptor de IP3. Un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} (desde niveles basales hasta 300nM) facilita la apertura del receptor, que por tanto puede funcionar como un canal de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR), lo que acelera la liberación desde los depósitos. En el caso de los receptores de IP3 tipo 1 este efecto activador deja de ser eficaz para $[Ca^{2+}]_i$ superior a 300nM, pasando a tener efectos negativos sobre la liberación de Ca^{2+} , aunque en otros subtipos esto no es así (129).

La actividad del canal de IP3 puede estar también regulada por los nucleótidos plasmáticos AMPc, GMPc y ATP. En muchos tipos de músculo liso como, por ejemplo, el músculo liso arterial, el AMPc ejerce un papel inhibitorio sobre la liberación de Ca^{2+} a través de IP3 (130). El mismo efecto ha sido encontrado para el GMPc, el cual disminuye la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante la puesta en marcha de distintos mecanismos como la inhibición del IP3R (131). En cuanto al ATP, éste actúa como un regulador alostérico o cofactor, de modo que $[ATP]$ menores de 0.5mM en presencia de IP3 aumentan la actividad del IP3R, mientras que niveles superiores disminuyen su actividad debido a que el ATP se une competitivamente al sitio de unión del IP3 (132). Así mismo $[ATP]$ intracelulares elevadas favorecen la pérdida de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares a través de los IP3R regulando, por tanto, el estado de llenado de los depósitos (133).

La potenciación en la apertura de ambos tipos de receptores (RyR e IP3R) por la presencia de Ca^{2+} permite la interacción entre distintas vías de liberación de Ca^{2+} , ya que si los canales están lo suficientemente próximos el Ca^{2+} liberado a través de uno de ellos estimula la liberación de Ca^{2+} por el otro tipo. Este tipo de interacción podría conducir a la generación de ondas de Ca^{2+} regenerativas. En vesícula biliar de cobaya recientemente se ha descrito la presencia de un depósito de calcio que expresa tanto receptores para el IP3 como RYR, posee pérdidas espontáneas y su recarga es a través de la bomba SERCA, aunque la característica más importante de dicho depósito es que la liberación a través de receptores para el IP3 tiene

capacidad pro-contráctil mientras que el calcio liberado a través de RYRs tiene un papel pro-relajante (134).

NAADPR Receptor sensible al ácido nicotínico adenín difosfato

Otro mensajero intracelular capaz de liberar calcio desde depósitos es el ácido nicotínico adenín difosfato (NAADP). El NAADP es una molécula lineal sintetizada, al igual que la ADPribosa cíclica, por la enzima ADP-ribosil ciclasa y su homólogo CD38, los cuales intercambian el grupo nicotinamida del ADP por ácido nicotínico (135).

La vía por la que el NAADP libera Ca^{2+} está poco caracterizada. Distintos estudios sugieren que el NAADP moviliza Ca^{2+} mediante un mecanismo distinto al usado por IP3 y ADPribosa cíclica, habiéndose sugerido la activación de un posible receptor sensible a NAADP e insensible a antagonistas de los IP3R y RyR (136).

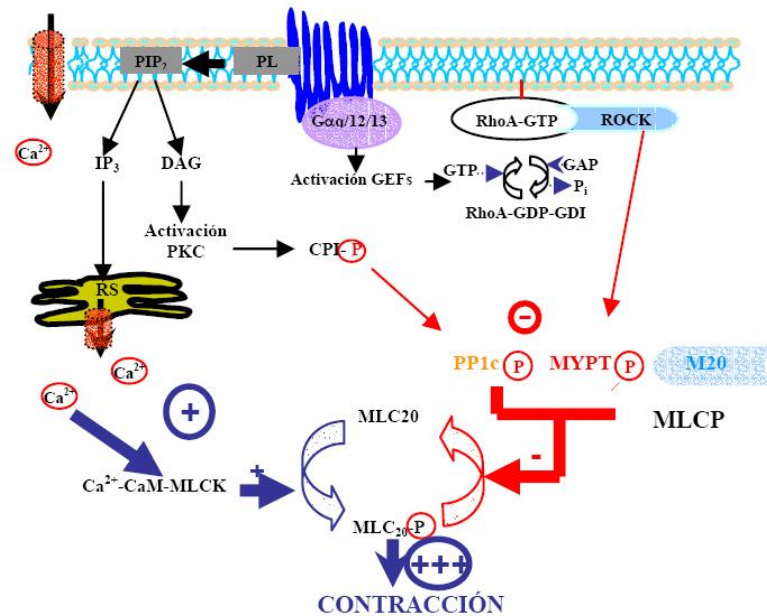
La liberación de Ca^{2+} inducida por el NAADP tiene lugar desde depósitos que son física y farmacológicamente distintos a los activados por el IP3 y la ADPribosa cíclica (137). En varios modelos celulares, los resultados indican que se tratan de orgánulos ácidos insensibles a tapsigargina y ácido ciclopiazónico, sugiriendo la presencia de una nueva Ca^{2+} -ATPasa insensible a estos inhibidores y/o la participación de bombas tipo V y/o intercambiadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ en el transporte de Ca^{2+} al interior del depósito (138).

Sensibilización al calcio.

La fosforilación del residuo Ser19 de la MLC20 mediante la MLCK es esencial para estimular la actividad ATPasa de la cabeza de miosina y, de este modo, iniciar la interacción entre la actina y la miosina que desencadenan la contracción. Tal y como se ha comentado anteriormente, en este fenómeno está directamente implicado el ion calcio, ya que, de no unirse a la calmodulina, la MLCK no se activaría y no se produciría la contracción. Sin embargo, un hecho constatable es que el calcio desencadenante del proceso inicial de la contracción se retira del citoplasma de manera rápida y efectiva por la recaptación del ion al RE o los mecanismos de extrusión anteriormente descritos. A pesar de esta disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y de la actividad de la MLCK, la realidad fisiológica del músculo liso refleja que la fosforilación de la MLC20 y, por lo tanto la contracción, se mantienen. Himpens y cols. propusieron en 1990 que el acoplamiento farmacomecánico puede modular la contracción alterando la sensibilidad del aparato contráctil a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante un mecanismo acoplado a proteínas G, actuando conjuntamente con el mecanismo clásico de la contracción que lleva implícito el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (139) Este mecanismo de contracción “no clásico” se ha denominado “sensibilización al calcio”.

El nivel de fosforilación de la MLC20 y por tanto el grado de contracción, es determinado por el balance entre las actividades de fosforilación y desfosforilación de la cadena ligera y por tanto por la relación de actividad MLCK/MLCP (139). El mecanismo de sensibilización al calcio en el músculo liso cobra gran importancia en el mantenimiento de la respuesta contráctil y alteraciones de este mecanismo pueden explicar condiciones patológicas de este tejido (139;140).

Tanto la activación de la fosforilación de la MLC20 por mecanismos independientes de la $[Ca^{2+}]_i$, como la inhibición de la desfosforilación de esta cadena, darán lugar a un aumento global en los niveles de P-MLC20 para un determinado incremento de $[Ca^{2+}]_i$ y por tanto a una mayor sensibilidad al Ca^{2+} por parte de los filamentos contráctiles.



Principales vías de sensibilización al calcio

CÉLULAS PANCREÁTICAS EXOCRINAS

El páncreas exocrino es una glándula que elabora y secreta un jugo rico en enzimas digestivas y bicarbonato. Dicho proceso es llevado a cabo por células acinares y ductales en respuesta al neurotransmisor ACh y a las hormonas colecistoquinina (CCK), secretina, péptido liberador de gastrina (GRP) y péptido intestinal vasoactivo (VIP). Estudios recientes también demuestran la influencia del péptido similar al glucagón (GLP-1) (141) y la presencia de receptores canabinoides CB-1 y CB-2, aunque éstos últimos no han demostrado efecto sobre la secreción de amilasa en acinos pancreáticos (142).

El mecanismo por el cual las células pancreáticas responden a los agonistas anteriormente mencionados dando lugar a la secreción de proteínas o iones, se denomina “acoplamiento estímulo-secreción” (143;144). Este acoplamiento necesita de la interacción coordinada de

receptores de membrana, mensajeros intracelulares, efectores celulares y mecanismos de exocitosis.

RECEPTORES Y SEÑALIZACIÓN TRANSMEMBRANA

Los receptores de los principales secretagogos pancreáticos son proteínas de membrana acopladas a proteína G con siete dominios transmembrana. Desde un punto de vista funcional, los más importantes son los receptores de la CCK y la ACh. En cuanto a la CCK, se han descrito dos tipos de receptores presentes en la membrana de las células acinares: CCK1 y CCK2 (145), siendo el primero específico para CCK y el segundo capaz de unir tanto CCK como gastrina. En el ratón se ha estudiado ampliamente el subtipo CCK1, mientras que en la especie humana aún no está claro que las células acinares presenten ninguno de los receptores, actuando la CCK a través de receptores en las terminaciones nerviosas aferentes (146). En cuanto al receptor muscarínico para la ACh, el subtipo presente en células humanas y de ratón es el M3 (147). Tanto éste como el receptor CCK1 presentan estados de alta y baja afinidad, de forma que altas concentraciones de sus agonistas pueden inducir bajas liberaciones de amilasa.

Como se menciona en el párrafo anterior, los receptores de membrana para los principales agentes secretagogos están acoplados a proteína G. La proteína G es un heterotrímero formado por tres subunidades: α , β y γ , cuyo cambio conformacional en respuesta a la unión del ligando a su receptor, desencadena la activación del efector de membrana. Para dar lugar a esta activación, la subunidad α une GTP que proporciona la energía para el cambio conformacional, consistente en la separación de la subunidad α del complejo $\beta\gamma$. Existen cuatro familias principales de proteínas G: G_q , G_s , $G_{i/o}$ y $G_{12/13}$ (148), que se diferencian entre ellas tanto a nivel estructural como de efectores que median su acción. Así, las proteínas de la familia G_q tienen como efector a la fosfolipasa C (PLC), que induce la escisión del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP_2) en inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), dando lugar a la liberación de calcio desde depósitos intracelulares y a la activación de la proteína cinasa C (PKC), respectivamente. Esta familia media la respuesta a CCK, ACh y bombesina. En cuanto a la familia G_s , son responsables del acoplamiento de los receptores de VIP y somatostatina a la adenilato ciclasa (AC), dando lugar a la síntesis de AMPc a partir de ATP. La familia $G_{i/o}$ media la inhibición de la AC por parte de la somatostatina y la $G_{12/13}$ da lugar a la activación de Rho, contribuyendo a la secreción en respuesta a CCK o análogos colinérgicos mediante remodelado del citoesqueleto (149).

MENSAJEROS INTRACELULARES

Inositol trifosfato (IP_3)

La unión de los principales secretagogos para las células acinares provoca la estimulación de la PLC, que da lugar a la formación de IP_3 y DAG 29. Aproximadamente a los 5 segundos tras la unión del agonista, la concentración de IP_3 alcanza un su pico máximo. Tras este pico inicial la concentración disminuye rápidamente, pero manteniendo valores superiores a los

basales por un periodo de varios minutos (150). El IP₃ difunde por el citoplasma y a través de su receptor, el InsP₃R, libera calcio desde depósitos no mitocondriales (151).

Diacilglicerol (DAG)

Liberado conjuntamente con el anterior, el DAG es el activador endógeno de la proteína cinasa C (PKC), enzima implicada en multitud de funciones celulares como la proliferación, la diferenciación y la secreción (152). De igual modo que en el caso del IP₃, la concentración de DAG experimenta una brusca subida en torno a los 5 segundos tras la exposición al agonista. Sin embargo, tras esa subida inicial la concentración continúa subiendo durante varios minutos (153). Concentraciones bajas de agonistas (3-20pM CCK) o agonistas parciales del receptor de la CCK como el JMV-180, no provocan una subida rápida de la concentración de DAG, sino que solamente dan lugar al aumento posterior en su concentración (154). La subida posterior al primer pico no se correlaciona con los niveles de IP₃, esto es debido a que el DAG no tiene como único origen el fosfatidil inositol, sino que puede derivar de otros fosfolípidos de membrana, como la fosfatidilcolina (155).

Adenosín mono-fosfato cíclico (AMPC)

Junto con el calcio, el AMPC juega un papel central en la regulación de la secreción acinar pancreática. No obstante, su importancia varía en gran medida dependiendo de la especie estudiada. Así, en el cobaya tiene una gran influencia, en ratón y rata tiene un pequeño efecto por sí solo, aunque potencia la acción de otros agonistas liberadores de calcio, y en otras especies como el perro, el gato o el humano carece prácticamente de efecto (156). El péptido vasoactivo intestinal (VIP) y la secretina son los principales agonistas fisiológicos que estimulan la producción de AMPC, activando la adenilato ciclasa de la membrana plasmática (157).

Movilización de calcio intracelular

De todos los mecanismos de señalización intracelular, la movilización de Ca²⁺ es el más estudiado y caracterizado. Esta vía consiste en aumentos transitorios de la [Ca²⁺]_i; producidos por numerosos mensajeros intracelulares.

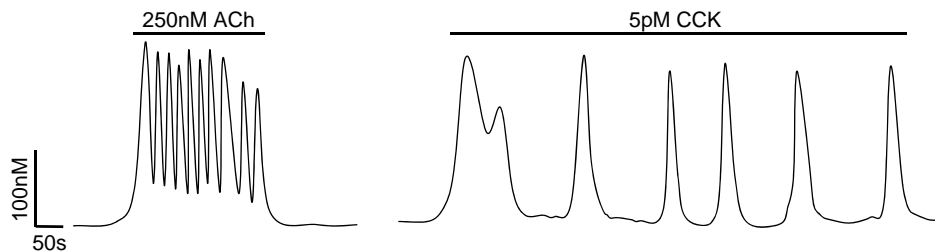
Respuesta de calcio a concentraciones máximas de agonistas

La aplicación a las células acinares de CCK, ACh o bombensina provoca señales de Ca²⁺ similares de en torno a 5-12 veces la concentración basal de Ca²⁺. La respuesta observada en estas células se compone de un pico rápido inicial a consecuencia de la liberación de Ca²⁺ desde depósitos intracelulares, seguido de una fase de *plateau* más baja que se mantiene mientras el agonista esté presente. La fase de *plateau* se debe a la entrada de Ca²⁺ desde el medio extracelular, como demuestran experimentos en los que se elimina el Ca²⁺ del medio extracelular y esta fase no se manifiesta (158). La entrada de calcio desde el exterior desencadenada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio se denomina “entrada capacitativa de calcio” (SOCE). Recientemente se ha descrito que el sensor que indica el vaciado del retículo endoplásmico es la molécula STIM-1 (Molécula de interacción del estroma-1). STIM-1 posee un dominio EF-hand de unión al calcio en su región localizada en el interior del retículo. Cuando la

concentración de calcio descende, STIM tiende a unirse con proteínas de la membrana celular para formar un poro de entrada de calcio. Orai-1 se ha propuesto como principal candidato a ser la proteína de unión que conforma junto con STIM1 el canal de la entrada capacitativa de calcio (159;160). También los TRPCs (Transient receptor potential channels) contribuyen a este fenómeno, habiéndose descrito que STIM-1 también funciona como sensor para estos canales. Existen estudios que apuntan la posibilidad de formación de un trímero STIM-1/TRPC/Orai-1 que intervenga en la SOCE de las células acinares pancreáticas (161;162).

Respuesta de calcio a concentraciones fisiológicas de agonistas

El patrón de respuesta a concentraciones fisiológicas de CCK (1-50pM) o ACh (50-300nM) difiere mucho del descrito anteriormente. En estas condiciones, la respuesta consiste en oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} , presentando patrones distintos para el estímulo con CCK o ACh, como se muestra en la figura 4 (163).



Patrones de respuesta de calcio en células pancreáticas a ACh y CCK

Estudios recientes indican que este comportamiento es debido a la dinámica de liberación y recaptación de Ca^{2+} de los depósitos, aunque es posible que fluctuaciones en la concentración de IP3 contribuyan (163). La entrada de calcio desde el medio extracelular es necesaria para el mantenimiento del patrón oscilatorio (164).

Propiedades espaciales de la señal de calcio

A comienzos de los 90, Kasai y Agustine demostraron una marcada heterogenicidad de la señal de calcio en células acinares pancreáticas. En su estudio observaron cómo la respuesta a una dosis máxima de ACh inició una liberación de Ca^{2+} en la zona apical de la célula que posteriormente se extendió por el citoplasma hasta la zona basal (165). Estos datos concuerdan con estudios contemporáneos en los que se describe que los receptores para los agentes secretagogos están en la membrana basolateral de la célula (166). También se observa la aparición de “olas” de Ca^{2+} en respuesta a dosis máximas de CCK y en las oscilaciones inducidas por concentraciones fisiológicas de ACh o C-CK. La zona en la que tiene lugar la liberación inicial de Ca^{2+} se llama “zona gatillo” (167).

Esta propiedad espacial de la señal de calcio se le atribuye fundamentalmente a la distribución heterogénea que presentan sus canales de liberación desde depósitos, sin embargo, hay estudios que sugieren que los componentes de la SOCE también se distribuyen

heterogéneamente, estando la mayoría de los canales TRPC y Orai-1 en la membrana apical y lateral (161).

Mecanismos celulares responsables de la distribución espaciotemporal de la señal de calcio

- **Liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 :** Los receptores para este compuesto se localizan exclusivamente en el retículo endoplásmico y tienen una distribución polarizada, encontrándose en mayores cantidades en el extremo apical de la célula (168). Se conocen tres familias del receptor del IP_3 , (IP_3 -1, IP_3 -2 e IP_3 -3), todas ellas descritas en células pancreáticas (169). Su estructura consiste en cuatro subunidades que conforman un heterotetrámero en el que cada subunidad tiene un sitio de unión para el IP_3 . Esta unión provoca la generación de un canal catiónico a través del cual sale el Ca^{2+} (170). El canal del IP_3 está regulado bifásicamente por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, aumentando su probabilidad de apertura a concentraciones bajas (0.5-1 μM) y reduciéndose cuando el calcio está a mayores concentraciones (171). Esta regulación parece tener una importancia capital en la distribución espaciotemporal de la señal de calcio en las células del páncreas 137 (172). Además también se regula por fosfoquinasa A, reduciendo ésta la actividad del receptor, por ATP y por el complejo $\beta\gamma$ de las proteínas G (173).
- **Liberación de Ca^{2+} a través de receptores de rianodina:** El receptor de rianodina (RyR) guarda diversas similitudes con el del IP_3 , tanto estructurales como de perfil de agonistas. Sin embargo, mientras que el receptor del IP_3 siempre necesita de la unión de éste para activarse, el canal de rianodina puede hacerlo sólo en respuesta a Ca^{2+} , mediante un mecanismo llamado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . (CIRC Calcium Induced Calcium Release, por sus siglas en inglés). La cafeína es agonista del RyR y es ampliamente utilizada en el músculo para liberar calcio desde el RE. Contrariamente, en el páncreas la cafeína no provoca liberación de Ca^{2+} , llegando incluso a disminuir la secreción por inhibición de la PLC (174). La distribución espacial de este receptor es complementaria a la del IP_3 , de manera que se cree que el RyR participa fundamentalmente en la propagación de la ola de calcio hasta las zonas basales de la célula (175). Además de por Ca^{2+} , el RyR puede activarse también por ADPr cíclica (176).
- **Liberación de Ca^{2+} inducida por NAADP:** Esta vía no parece estar involucrada en la CICR ni en la propagación de la ola de calcio (177), sin embargo se ha propuesto al NAADP como iniciador en la respuesta de calcio, desencadenando el reclutamiento de RyR e IP_3 con una primera liberación de Ca^{2+} desde los depósitos acídicos (178). Dicha liberación depende de la concentración de NAADP, ya que concentraciones bajas (nM) inducen la liberación de Ca^{2+} , mientras que concentraciones mayores (μM) provocan desensibilización, afectando tanto a la respuesta a NAADP como a la inducida por concentraciones fisiológicas de CCK (179). Este hecho sugiere que, en estas condiciones, CCK y NAADP comparten un mecanismo para inducir la liberación de calcio. Estudios recientes

- sugieren la posibilidad de que parte de los efectos del NAADP son mediados por proteínas de la familia del canal de 2 poros (TPC, por sus siglas en inglés) (180).
- **Aclaramiento de la señal de Ca^{2+} :** Tras el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocado por los mecanismos anteriores es necesario disminuir ésta hasta niveles basales, ya que concentraciones altas de calcio sostenidas suponen una señal deletérea para la célula. Para ello la célula cuenta con varias bombas y canales en la membrana plasmática y sus orgánulos. La bomba ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA) constituye el principal mecanismo de extrusión de calcio. Su distribución en la membrana plasmática está focalizada en la zona apical de la célula (181). También contribuyen a la aclaración de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ las bombas del RE (SERCA) que almacenan Ca^{2+} en este orgánulo. En las células pancreáticas existen las isoformas SERCA 2A y 2B, localizándose la primera en el polo apical y la SERCA 2B en la zona basal (181). La mitocondria también constituye un mecanismo importante en la extrusión del calcio citosólico, pudiendo absorber grandes cantidades a través del uniporter de calcio presente en su membrana (182).

Comunicación intercelular de la señal de calcio

Las células acinares pancreáticas- están ampliamente comunicadas entre sí mediante uniones hendidas o “gap junctions” (183). Estos canales permiten el paso de pequeñas moléculas de alrededor de 1-2kDa y generan un acoplamiento eléctrico entre grupos grandes de células. Solamente concentraciones fisiológicas de CCK y bombesina actúan eficazmente por esta vía, ya que concentraciones mayores o la -estimulación con ACh conlleva el cierre de las “gap junctions”. Las oscilaciones inducidas por CCK en acinos pancreáticos parecen estar iniciadas por una sola célula marcapasos con mayor sensibilidad que el resto para la CCK. La transmisión de la señal de calcio entre células parece estar mediada por IP_3 y pequeñas cantidades de Ca^{2+} (184).

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS MENSAJEROS INTRACELULARES

La activación de fosfatasa o cinasas, es el mecanismo que usan los segundos mensajeros descritos en el apartado anterior para regular la fosforilación de proteínas presentes en los gránulos de zimógeno, y consecuentemente inducir su vaciado.

Proteín cinasa A (PKA)

El mecanismo de acción del AMPc consiste fundamentalmente en la activación de la proteín cinasa A (PKA) (185). Se han descrito dos isoformas de esta enzima (Tipos I y II) y ambas están presentes en el páncreas, concretamente en los gránulos de zimógeno y en las cisternas del RE rugoso (186). Además de activar la PKA, el AMPc puede actuar a través de la activación de las proteínas Epac (Proteínas de intercambio activadas directamente por AMPc) (187), cuya isoforma Epac2 se localiza en la zona donde están los gránulos de zimógeno. Ambas vías (PKA y Epac2) están relacionadas con la secreción o la potenciación de la secreción inducida por VIP o secretina.

Proteín cinasa C (PKC)

Esta familia de cinasas dependientes de fosfolípidos está implicada en multitud de procesos biológicos como la diferenciación celular o la secreción. Dependiendo de su estructura y mecanismo de activación se dividen en tres grupos: Convencionales, nuevas y atípicas. La activación de las primeras (α , β I, β II y γ) se produce por Ca^{2+} y DAG, las nuevas (δ , ϵ , η y θ) requieren DAG pero son independientes de Ca^{2+} , por último el subgrupo de PKCs atípicas (ξ , λ , ν y μ) son independientes tanto de DAG como de Ca^{2+} (188). Todas las isoformas se encuentran en estado inactivo en el citoplasma, pero cuando se activan migran a la membrana para interactuar con los receptores de las cinasas C activas (RACKs) (189). No se conocen con exactitud las dianas moleculares para la acción de las PKCs, sin embargo se ha demostrado su actividad en fracciones celulares que contienen gránulos de zimógeno (190).

Cinasas activadas por Ca^{2+} -calmodulina

A pesar de que el Ca^{2+} puede activar directamente algunas enzimas, la mayoría de sus acciones requieren de la participación de proteínas de unión de Ca^{2+} . La calmodulina es la proteína de este tipo más abundante en las células pancreáticas y se ha demostrado su participación en la activación de múltiples enzimas, especialmente cinasas, como la cinasa cadena ligera de miosina (MLCK) (191). El papel de esta enzima en la secreción pancreática se puso de manifiesto por la abolición de la secreción provocada por ML-9, un inhibidor de la MLCK (192). También se cree que es la responsable de la fosforilación de la cadena ligera de miosina que tiene lugar en acinos pancreáticos estimulados con CCK (193).

Tirosina cinasas

Estas enzimas son las responsables de la fosforilación de proteínas en células acinares pancreáticas inducida por CCK. Estudios con inhibidores de las tirosina cinasas sugieren que su

acción es necesaria para la liberación de amilasa inducida por hormonas, ya que el bloqueo de su actuación con genisteína inhibe la secreción de amilasa (194).

Proteín fosfatasas

El equilibrio entre la actividad cinasa y fosfatasa determina el estado de fosforilación de las proteínas celulares. En las células acinares de páncreas se han descrito los subtipos 1, 2A y 2B (195;196), pero su participación en la secreción de amilasa se encuentra actualmente en entredicho debido al débil efecto observado en la secreción con el uso de inhibidores específicos de estas enzimas, como el FK506 (197).

EXOCITOSIS

El fin último del proceso de acoplamiento estímulo-secreción es la exocitosis de los gránulos de zimógeno. En este proceso se requiere el transporte y la señalización tanto de los gránulos de zimógeno como de las proteínas de la membrana apical. Para ello es necesaria la participación del citoesqueleto y de proteínas de las familias SNARE y Rab. El citoesqueleto contribuye mediante el mantenimiento de la morfología y la compartimentalización celular, a la vez que dirige los gránulos hacia el polo apical de la célula (198). Las proteínas Rab posibilitan el contacto inicial entre la membrana de los gránulos de secreción y la membrana celular, en un proceso denominado “Atraque” (149). Seguidamente, la fusión de ambas membranas se lleva a cabo gracias a las proteínas SNARE, que anclan las membranas y facilitan la energía necesaria en el proceso (199).

EL COLON

DESCRIPCIÓN ANATÓMICA E HISTOLÓGICA.

El colon es un órgano tubular que se extiende desde la válvula ileocecal hasta el recto. Su longitud oscila entre 90 y 150cm y sus funciones principales son la absorción de agua y electrolitos así como la generación y almacenaje de heces para su posterior eliminación de forma controlada (200).

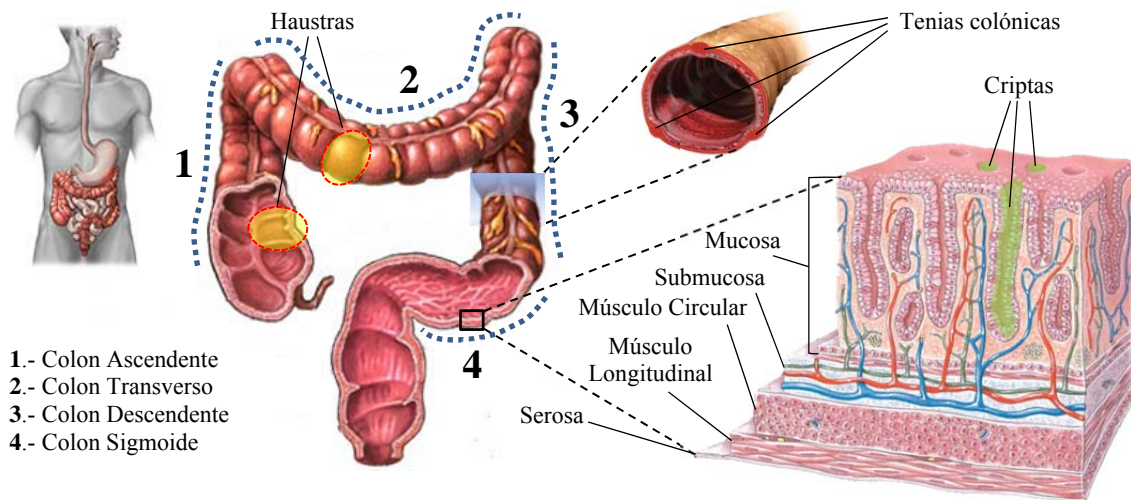
Los cuatro segmentos en los que se divide este órgano son los siguientes: Colon ascendente, transverso, descendente y sigmoide. El tramo ascendente está en posición vertical en el lado derecho del abdomen, extendiéndose hacia arriba hasta el borde inferior del hígado. El íleon se comunica con el intestino grueso en la unión del ciego y el colon ascendente, mediante la válvula ileocecal. Dicha válvula es unidireccional, por lo que impide el movimiento retrógrado del contenido colónico de vuelta al intestino delgado. El colon transverso cruza horizontalmente el abdomen, por debajo del hígado, estómago y bazo, y por encima del intestino delgado. Esta sección se extiende desde el ángulo hepático hasta el ángulo esplénico, puntos ambos en los que el colon presenta giros sobre sí mismo de 90 grados. El tramo descendente del colon está en posición vertical en el lado izquierdo del abdomen, extendiéndose desde el ángulo esplénico hasta la cresta ilíaca. Por último, el colon sigmoide es la porción que se dirige hacia abajo desde la cresta ilíaca y conecta con el recto. Se denomina sigmoide porque describe una curva en forma de “S” (201;202). Los segmentos ascendente y descendente del colon se localizan en posición retroperitoneal, al igual que el recto, mientras que el colon transverso y sigmoide son intraperitoneales. La posición de estos dos últimos, unida a su menor grado de fijación, hacen de ellos las zonas más propensas a girar sobre mismas y dar lugar a vólvulos (200).

A pesar de constituir un solo órgano, existen diferencias regionales que fundamentan su división en colon derecho e izquierdo; considerándose el colon ascendente y transverso como “colon derecho” y el descendente y sigmoide como “colon izquierdo”. En primer lugar, su origen embrionario es diferente, derivando el colon izquierdo del intestino embrionario medial y el colon derecho de la porción intestino embrionario distal. Este origen distinto determina también diferencias a nivel de riego e inervación; así, el colon derecho está inervado por el nervio vago y el ganglio mesentérico superior e irrigado por las arterias mesentéricas superiores, mientras que la parte izquierda recibe inervación de las raíces sacras S2-4 y el ganglio mesentérico inferior e irrigación desde las arterias mesentéricas inferiores (203).

Histológicamente, la pared del intestino grueso está compuesta por cuatro capas: Mucosa, submucosa, muscular y serosa. Además bajo la submucosa y en el interior de la capa muscular se encuentran dos plexos nerviosos; el plexo submucoso (o de Meissner) y el plexo mientérico (o de Auerbach). La mucosa consiste en un epitelio cilíndrico simple asentado sobre una base de tejido conectivo, o lámina propia, y una fina lámina de tejido muscular liso llamada *muscularis*

mucosae. El epitelio se compone en su mayor parte de células absortivas y células caliciformes siendo la absorción de agua la función principal de las primeras, y la secreción de mucus la de las segundas. Estas células se disponen formando glándulas rectas y tubulares, denominadas criptas de Lieberkühn. La superficie de la mucosa del colon no presenta vellosidades, como ocurre en el intestino delgado. Esto es debido a que no necesita tantas adaptaciones estructurales para incrementar su área de superficie, dado que la absorción que lleva a cabo es mucho menor que la del intestino delgado (200;202). La submucosa es una capa de tejido conectivo areolar en la que además se asienta una nutrida red de vasos sanguíneos y linfáticos. Inmerso en la submucosa se encuentra el plexo submucoso o de Meissner, encargado fundamentalmente de integrar las aferencias sensitivas provenientes de la mucosa. El siguiente estrato de la pared colónica es la capa muscular. El músculo liso que la forma adopta dos orientaciones distintas, dando lugar a una capa de músculo dispuesta en sentido circular, más interna, y una capa longitudinal situada más externamente. El músculo circular presenta mayoritariamente más grosor y se dispone uniformemente en toda su superficie. Por el contrario, la capa longitudinal es fina e irregular, presentando tres bandas en las que se engrosa notablemente, dando lugar a las tenias colónicas. Las tenias se extienden por toda la longitud del colon y debido al ligero grado de contracción tónica que desarrollan, dan lugar a unas formaciones llamadas haustras, que le dan al colon humano su aspecto fruncido (202;203). La capa más externa del órgano es la serosa, que forma parte del peritoneo visceral. En esta capa, insertadas en las tenias del colon, se desarrollan unas pequeñas bolsas rellenas de grasa denominadas apéndice epiploicos u omentales.

Dos de las principales especies empleadas en estudios científicos son el ratón y el cobaya. A nivel del intestino grueso, ambas especies han desarrollado adaptaciones anatómicas y funcionales derivadas de su alimentación que han de ser tenidas en cuenta a la hora de realizar



Representación de las principales divisiones anatómicas e histológicas del colon humano, así como de sus estructuras más representativas. (Composición realizada con ilustraciones de A.D.A.M. Illustrated Medical Encyclopedia y Tortora GJ, Derrickson B. El aparato digestivo.)

estudios en estos animales. En primer lugar, las dos especies tienen un ciego muy desarrollado, mayor en el caso del cobaya, donde llevan a cabo una fermentación bacteriana de la fibra del alimento y también la síntesis de algunas vitaminas que posteriormente serán aprovechadas por cecotrofia. El ciego del cobaya tiene tres tenias longitudinales y saculaciones, mientras que el del ratón presenta una superficie lisa (204-206). En cuanto al colon, la terminología empleada para designar las diferentes regiones es diferente a la usada en la especie humana. Así, la primera parte del colon se denomina colon proximal y en el cobaya está ampliamente desarrollado, presentando un giro proximal, por detrás del ciego y seguidamente una zona llamada *ansa spiralis*, que consiste en una espiral con dos giros centrípetos y otros dos giros centrífugos (206). Además el colon proximal del cobaya tiene dos tenias a ambos lados de la inserción del mesenterio. En el ratón el colon proximal es más simple y su dimensión viene determinada por unos pliegues de la mucosa que son visibles a través de la pared del órgano. El colon medial se correspondería con el transversal de la especie humana. Esta parte carece de giros en ambas especies experimentales y su mucosa es plana. Por último, el colon distal puede identificarse fácilmente tanto en ratón como en cobaya por la presencia de heces formadas en su interior. De nuevo, el cobaya presenta un colon distal más largo y complejo, con varios giros antes de adentrarse en la zona pélvica y conectar con el recto (206). El ratón tiene como particularidad la presencia de pliegues longitudinales en la mucosa del colon distal (205) y una mayor presencia de formaciones linfoides circulares denominadas placas de Peyer.

MOTILIDAD COLÓNICA.

La motilidad del colon se caracteriza por contracciones coordinadas de las capas musculares que componen este órgano. La maquinaria implicada en este proceso se extiende por toda su longitud y además de células que forman parte propiamente del colon (neuronas, células gliales, células intersticiales de Cajal (ICCs), células musculares lisas, enterocromafines, macrófagos y células similares a los fibroblastos (FL-Cs), la motilidad colónica se ve influenciada también por las aferencias del sistema nervioso autónomo (207;208). La motilidad del tracto gastrointestinal se organiza fundamentalmente en tres niveles jerárquicos: el propio músculo liso, las células intersticiales de Cajal (ICC, *Interstitial Cells of Cajal*) y el sistema nervioso vegetativo. Las células musculares, que son el elemento motor final y el nivel más sencillo en esta organización funcional, presentan diversos patrones de actividad, tanto inducidos como autónomos, que determinan su contracción. En un segundo nivel, las ICC actúan como generadores de ritmos que se propagan por la musculatura lisa. Por último el sistema nervioso vegetativo actúa sobre estos dos niveles, para adecuar la motilidad a las necesidades digestivas del organismo (209).

Por otro lado, la mera acción mecánica ejercida sobre su contenido, hace que contracciones en una región tengan efecto o influyan sobre zonas distantes del colon, de forma similar a como lo hacen los procesos de secreción o absorción que tienen lugar en las paredes de este órgano (203). Todo este horizonte de variables, unido a la posible influencia ejercida por los métodos de medición de la motilidad y a las diferencias interespecíficas, hacen del estudio de

este fenómeno una tarea ardua y necesitada de complejos análisis que integren todas estas influencias.

Existen multitud de métodos para medir la motilidad del colon, empleando cada uno de ellos diferentes aproximaciones. El fin último del estudio mediante estas técnicas consiste en la integración de toda la información obtenida con cada una de ellas para arrojar luz sobre la complejidad de este proceso. Así, pueden clasificarse las mencionadas técnicas en directas e indirectas, siendo las primeras aquellas que miden la actividad de la pared muscular y las otras las que miden cambios en la presión intraluminal o en el flujo de contenido colónico(203). El grupo de técnicas directas engloba medidas eléctricas del potencial de membrana, como la técnica de *patch clamp*, el uso de electrodos intracelulares o de marcadores fluorescentes sensibles a voltaje (210;211). También forman parte de este grupo las medidas de calcio intracelular mediante marcadores sensibles a cambios en la concentración de este ion (212) y el registro de la fuerza de contracción de las paredes musculares con transductores isométricos (213). Además pueden medirse cambios en el diámetro de la luz del colon o acortamiento de sus paredes musculares haciendo uso de transductores isotónicos (214) o empleando técnicas de elaboración de mapas espaciotemporales (215). Por último se incluye en este apartado de técnicas directas, la medida de la impedancia intraluminal, a través de la cual pueden inferirse cambios en la distribución del contenido del órgano y más recientemente, el registro electrofisiológico de las aferencias mesentéricas, aportando este último una poderosa herramienta para la comprensión de la regulación externa de la motilidad espontánea del colon (216-218).

PAPEL DEL MÚSCULO LISO EN LA MOTILIDAD COLÓNICA.

El efector último de la actividad espontánea del colon son sus capas musculares. En ellas, las fibras musculares lisas se agrupan en una lámina externa dispuesta longitudinalmente y una capa interna, con células en sentido circular. Esta capa circular es más gruesa y homogénea, estando cohesionada por fibras de tejido conectivo. Por el contrario, el músculo longitudinal constituye una delgada lámina alrededor de la primera, a excepción de algunas zonas en las que se condensa formando potentes haces musculares conocidos como tenias (203). Estas estructuras no están presentes en todas las especies, si bien se han descrito en humanos, primates, caballos, cobayas, conejos..., no están presentes en otras especies como el ratón o el perro (205;219). En aquellas especies que presentan tenias, las paredes musculares del espacio entre ellas se adaptan formando saculaciones denominadas haustras. Esta disposición, en la que las tenias actúan como tirantes de sustentación sobre los que se contraen las haustras, hace que la contracción de la musculatura circular sea un proceso altamente eficiente, consiguiendo una disminución de diámetro del 59% con una contracción tan sólo del 17%. Si el músculo longitudinal se dispusiese uniformemente alrededor del circular, sólo se conseguiría una reducción de la luz colónica del 31% con una contracción equivalente (220). Además de favorecer una eficiente contracción del colon, algunos autores postulan que la función de estas saculaciones va más allá y que favorecen el proceso de fermentación fecal y la absorción de agua y electrolitos. Dichos procesos se verían favorecidos por la menor velocidad de flujo que tiene el contenido en el fondo de las haustras

(221;222). Tanto para este fenómeno como para posibilitar la acumulación periódica de materia fecal es necesaria la relajación de ambas capas musculares. Estudios iniciales sostuvieron la idea de que el músculo circular poseía circuitos de inervación distintos a los del longitudinal, de forma que la contracción de una de las capas conllevaría necesariamente la relajación de la otra (223). Posteriormente se descubrió que simplemente la interacción mecánica entre ellos y la necesidad de mantener la superficie tisular puede hacer que se comporten así (224). Actualmente se conoce que es posible que ambas capas se comporten de igual manera durante los movimientos peristálticos (225) y se ha demostrado que no existe una inervación diferenciada para cada capa (226). No obstante, en otros patrones motores y en preparaciones que presentan sólo una de las hojas musculares, se siguen observando comportamientos contrarios ante los mismos estímulos (227-229).

La actividad de la musculatura del colon está estrechamente regulada por circuitos neuronales, sin embargo, mecanismos propios de las células musculares ejercen también una influencia determinante sobre ella. Así, el potencial en reposo de estas células, que en el colon ronda los -50mV aproximadamente, es un factor crítico para el control de la excitabilidad (230). Dicho potencial no es uniforme a lo largo del espesor de la pared colónica. Existe una gradación de 10mV entre el exterior de la capa longitudinal y el borde submucoso del músculo circular, siendo éste último el más hiperpolarizado (231). Este fenómeno no es directamente trasladable a otras regiones del tubo digestivo, de hecho en el antro del estómago y el intestino delgado ocurre al revés; la zona próxima a la luz del órgano es la más despolarizada (232). El gradiente de despolarización se genera gracias al monóxido de carbono (CO) liberado por neuronas y ICCs (233;234), haciendo posible un reclutamiento selectivo de células musculares proporcional al de la magnitud del impulso excitador. De esta forma, pequeñas señales excitadoras reclutan solamente las células que se encuentran más despolarizadas y estímulos mayores consiguen superar también el umbral de aquellas más hiperpolarizadas. Estudios en ratones *knockout* carentes de hemo oxigenasa sugieren que el principal aporte de CO es el proveniente de las neuronas del plexo submucoso (235).

El potencial de membrana en reposo de las células musculares lisas está determinado por las permeabilidades relativas de su membrana plasmática a las distintas especies iónicas que se encuentran en el medio interno (236). La permeabilidad para el K^+ es la dominante en este tipo celular, si bien se encuentra influenciada por conductancias catiónicas no selectivas (NSCC) que hacen que el potencial tienda a ser menos hiperpolarizante (237). Además, la bomba Na^+/K^+ y posiblemente también canales de Na^+ (238), contribuyen al establecimiento final del potencial de membrana en valores que oscilan entre los -85 y los -40mV (236;239). Este amplio rango es debido a la diferente expresión de canales iónicos en las células musculares y a diferencias también en las probabilidades de apertura de dichos canales. La regulación de estos valores es un factor fundamental para el control de la excitabilidad en la musculatura lisa determinando las condiciones de respuesta de estas células a sus agonistas o a los ritmos impuestos por células marcapasos (236).

Existen tres fenómenos básicos de la actividad eléctrica miógena que contribuyen al establecimiento del patrón contráctil espontáneo del colon y que determinan diferentes

comportamientos en otras secciones del tracto gastrointestinal: Los cambios tónicos lentos del potencial de membrana, los potenciales de acción de calcio y las ondas lentas (230;236). Los cambios tónicos del potencial de membrana tienen lugar en zonas como el fundus gástrico y algunos esfínteres y son debidos a que sus células están relativamente despolarizadas, alcanzando valores en los que existe una pequeña pero sostenida probabilidad de apertura para canales de calcio voltaje-dependientes (VDCC), generando un flujo continuo de calcio al interior de la célula (240). Los potenciales de acción de calcio consisten en la activación de VDCC por despolarizaciones de la membrana. Pequeñas despolarizaciones, de alrededor de 10mV, pueden iniciar la activación regenerativa de estos canales dando lugar a un proceso en cadena que está limitado dinámicamente por las diferentes probabilidades de apertura de corrientes de salida a través de una gran variedad de canales de K^+ (241). Las contracciones tónicas de las tenias del colon y algunos esfínteres tienen su origen en repetidos potenciales de acción de calcio (236). Por último, las ondas lentas se caracterizan por una frecuencia de aparición baja, de unas 2-4 por minuto. Su origen reside en las ICCs, donde tienen lugar despolarizaciones espontáneas causadas por corrientes de entrada transitorias (Spontaneous Transient Inward Currents, STICs) a través de canales de cloro activados por calcio (CaCC, por sus siglas en inglés) (239). Estas variaciones cíclicas del potencial de membrana se transmiten a las células musculares a través del acoplamiento eléctrico que proporcionan las *gap junctions* (208), modificando la probabilidad de apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje de las células musculares. De esta manera, en el periodo comprendido entre dos ondas lentas, la probabilidad de apertura de estos canales es muy baja y por tanto, no tienen lugar contracciones importantes. A pesar de ello, el flujo de calcio puede ser suficiente para desencadenar la actuación de la maquinaria contráctil celular, pero siempre dando lugar a contracciones de pequeña magnitud (236). Por el contrario, durante la onda lenta tiene lugar una ligera despolarización (12mV) que es suficiente para activar canales de calcio tipo L y dar lugar a la entrada de calcio a la célula, con la consiguiente contracción asociada. La entrada de calcio y en consecuencia la magnitud de la contracción se verán aumentadas si sobre la onda lenta llega a superponerse un potencial de acción de calcio (236).

Independientemente de otros elementos que más adelante se describen, el músculo liso de la pared colónica presenta contracciones de corta duración (*SDC Short Duration Contractions*). Las SDC son ondas de presión estacionarias que sirven para mezclar el contenido intestinal y propiciar una adecuada absorción de agua. El fenómeno mioeléctrico que subyace en este patrón son salvas de potenciales de acción de corta duración que ocurren en fase con las ondas lentas del músculo liso. Su frecuencia de aparición en humanos es de 2 a 13 por minuto y su origen parece estar en el músculo circular, dado que es en preparaciones en las que esta capa está presente, donde únicamente se ha conseguido registrar este fenómeno (242;243). Por otro lado, también existen contracciones de larga duración (*LDC Long Duration Contractions*) que pueden ser estacionarias o propagarse cortas distancias en los dos sentidos del tránsito colónico. En el colon transversal, estas contracciones suelen propagarse en sentido oral, mientras que en zonas más distales lo hacen en el sentido contrario (244). Estas contracciones están generadas por salvas de potenciales de acción de larga duración, correspondientes a las oscilaciones de potencial miotéricas (MPO). A pesar de que los potenciales de acción en de las MPO ocurren

cada 2-3 segundos, la contracción resultante es una tetanización que dura todo lo que se prolonga el fenómeno eléctrico. Las LDCs suelen durar entre 20 y 60 segundos y sólo se han registrado en preparaciones de músculo longitudinal (242;243).

CÉLULAS INTERSTICIALES DE CAJAL Y SU IMPORTANCIA EN LA MOTILIDAD COLÓNICA

Las ICC son un tipo celular cuyo origen embrionario está en la hoja mesodérmica, de la cual derivan principalmente los tejidos conectivos y el tejido muscular. No comparten origen como hipotetizó su descubridor; D. Santiago Ramón y Cajal en la obra "*Histologie du système nerveux de l'homme et les vertébrés*", con el tejido neuronal (245). Dicha hipótesis se sustentaba en la localización de aquellas primeras células que descubrió el investigador español. Las ICC observadas por él se situaban al final de las terminaciones nerviosas del intestino, hecho que ha llevado a pensar a muchos otros investigadores que las ICC tienen un papel modulador de la transmisión de impulsos nerviosos al tejido muscular (246;247), si bien actualmente esta posibilidad está siendo cuestionada (208;248).

El desarrollo de nuevas técnicas histoquímicas y la aparición del microscopio electrónico dieron lugar a grandes avances en el conocimiento de la morfología y las relaciones de estas células, pero el acontecimiento más determinante en el desarrollo de investigaciones acerca de las ICC, fue el descubrimiento de que dichas células expresan el producto de un protooncogen denominado Kit (Receptor tirosina kinasa). Dicha característica fue descubierta al administrar anticuerpos anti-Kit a animales recién nacidos, con el objetivo de elucidar las consecuencias de una disminución en la función de Kit. A los diez días de la administración se observaba una anormal distensión gástrica, así como alteraciones en la contractilidad del tracto digestivo (249). Al estudiar estos animales se observó que prácticamente no presentaban ICC. Este hecho llevó a descubrir que la mayoría de las células Kit + del tracto gastrointestinal eran ICC (250) y que la expresión de Kit es necesaria para el correcto desarrollo de éstas. La aparición de esta nueva herramienta permite una identificación fácil y rápida a la vez que ofrece la posibilidad de manipular específicamente la población de ICC y obtener animales modificados genéticamente que carecen de dichas células. Esta última posibilidad ha sido profusamente aprovechada para el estudio de la función de las ICC, constatando que son las responsables de la actividad marcapasos del músculo liso gastrointestinal y que median en la transmisión nerviosa de este tejido (251).

Las ICC se caracterizan fundamentalmente por componentes ultraestructurales como la presencia de numerosas mitocondrias, abundantes filamentos intermedios, aparato de Golgi moderadamente desarrollado, presencia de retículo endoplásmico tanto liso como rugoso, contacto íntimo con varicosidades y terminales nerviosas y formación de gap junctions entre sí y con células musculares lisas (252). No obstante, existe cierto grado de heterogenicidad dentro de estas células, ya que dependiendo de la especie que consideremos e incluso de la posición dentro del tracto digestivo, pueden hallarse ICC similares a células musculares lisas (ICC Tipo 1) u otras con características propias de fibroblastos, como caveolas o lámina basal (ICC Tipo 3). Las

células intersticiales que presentan caveolas, pero no lámina basal se denominan ICC Tipo 2 (253;254).

Teniendo en cuenta la variabilidad morfológica descrita anteriormente, y el hecho de que algunas poblaciones de ICC permanecen en animales que no expresan Kit, no está totalmente esclarecido el que todos los tipos de ICC deriven de las mismas células progenitoras (255). Lo que si se ha podido demostrar es que su origen no es común al del sistema nervioso, sino que provienen de la hoja mesodérmica (256-258).

Distribución

Se han encontrado ICC a lo largo de todo el tubo digestivo, desde el esófago (259) hasta el esfínter anal interno (260). Dependiendo de su localización, estas células muestran diferentes patrones de distribución así como diferencias a nivel morfológico. Estas diferencias están determinadas principalmente por sus relaciones con los plexos nerviosos locales, la orientación de la capa muscular en la que están y la cantidad de conexiones que las ICC presentan entre sí (255).

ICC-MY (ICC del plexo mientérico): Células de tipo multipolar que presentan muchas interconexiones y que se disponen formando una red alrededor del plexo mientérico, entre las capas de músculo longitudinal y distal. Dicha red es menos profusa en el cuerpo del estómago y en el colon que en el intestino delgado (255).

ICC-IM (ICC intramusculares): Son principalmente células bipolares que se disponen siguiendo la orientación de las células musculares de la capa en la que están. Cabe mencionar que las presentes en la capa circular son más numerosas que las que aparecen en el músculo longitudinal. Contrariamente al tipo anterior, aquí la mayor densidad celular se encuentra en estómago y colon (255;258).

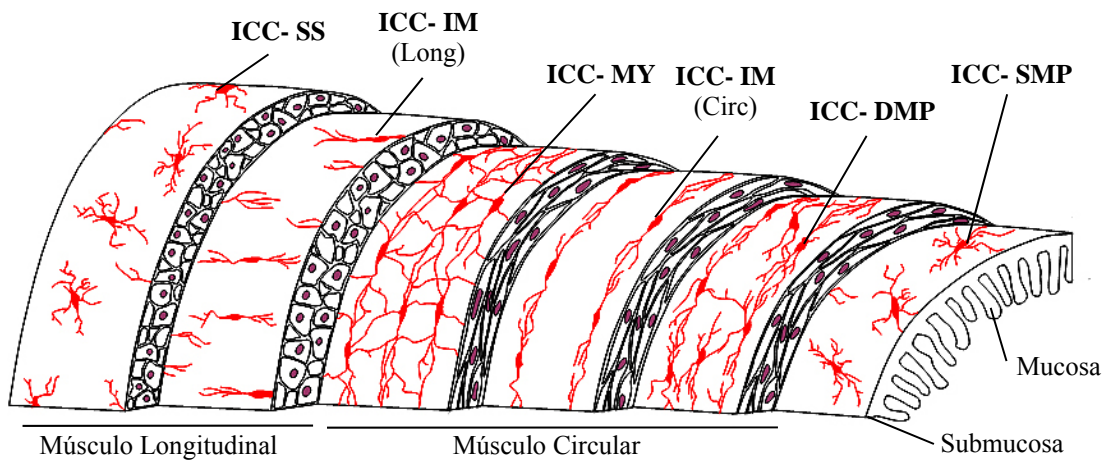
ICC-DMP (ICC del plexo muscular profundo): Esta subpoblación sólo se encuentra en el intestino delgado y está asociada a las terminaciones nerviosas presentes en el plexo muscular profundo. Son células multipolares (255).

ICC-SM/ICC-SMP (ICC de la submucosa/del plexo submucoso): Son células multipolares que están presentes sólo en la región pilórica del estómago (ICC-SM) (254) y en el colon (ICC-SMP) (261). Forman entre sí una red parecida a la de las ICC-MY pero no tan densa (262).

ICC-SS (ICC de la subserosa): Células de tipo multipolar ubicadas en la subserosa del intestino delgado (263) y del colon (264).

Cada uno de los tipos anteriores presenta una distribución uniforme, a lo largo de todo el intestino delgado y el colon, aunque se han reportado algunas diferencias en colon de ratón (265) y humano (266). El estómago, por el contrario, es el único órgano en el que se ha descrito una diferencia marcada entre su región distal y proximal, ya que en las regiones del cardias, fundus y

la mayor parte de la región escamosa del cuerpo, no existen ICC-MY y si aparecen ICC-IM. En la región glandular del cuerpo y en el píloro sucede lo contrario (267).



Disposición de las células intersticiales de Cajal (ICC) en las diferentes capas de la pared del tracto gastrointestinal.

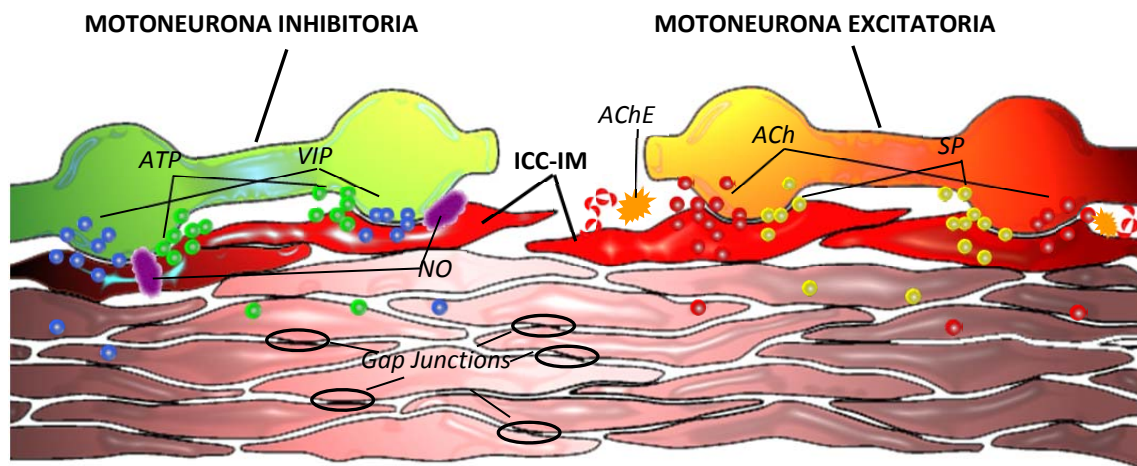
Función en el tracto gastrointestinal

Desde su descubrimiento y dada su situación, estas células se han postulado como mediadoras entre el sistema nervioso autónomo y la musculatura lisa del tracto digestivo. Dicha hipótesis no ha podido ser demostrada hasta finales del siglo XX, y aún hoy en día las ICC son objeto de numerosas investigaciones y protagonistas de no menos descubrimientos. Como ya apuntaba Ramón y Cajal, las ICC constituyen un nexo activo entre nervios y células musculares lisas, pero actualmente se conoce que también son responsables de la actividad marcapasos del intestino, de posibilitar la propagación de las ondas lentas en músculo liso, de percibir cambios en el nivel de llenado del tubo digestivo e incluso de generar señales aferentes (251).

La generación de la actividad marcapasos es debida a flujos de calcio entre la membrana plasmática, el retículo endoplásmico y las mitocondrias. Dicho flujo comienza cuando se libera calcio del retículo a través de canales de rianodina e IP3. Parte de este calcio es captado por la mitocondria debido a su potencial de membrana negativo, lo que da lugar a la activación de canales catiónicos no selectivos en la membrana plasmática (TRPs), provocando una corriente de entrada (Corriente marcapasos). También se cree posible que se activen canales de calcio activados por voltaje, canales de cloro activados por calcio y canales de potasio activados por calcio, pero no se conoce aún cuál es el canal que presenta las activaciones periódicas que desencadenarían cada ciclo. Para reiniciar el ciclo, el calcio del citoplasma es recaptado por el retículo vía SERCA y el presente en la mitocondria es expulsado por el intercambiador sodio/calcio (268). El tipo celular que actúa como marcapasos, controlando la frecuencia de las

contracciones fásicas de la túnica muscular, son las ICC-MY (269;270). Son también estas células las responsables de la propagación del estímulo, asegurando un avance coordinado de las ondas lentas por todo tracto digestivo (271). Dicha propagación es debida al acoplamiento eléctrico por medio de gap-junctions que presentan estas células y a su disposición formando una red a lo largo de todo el plexo mientérico.

Otra función fundamental de las ICC es la mediación de la actividad nerviosa gastrointestinal. Dicha función es llevada a cabo principalmente por las ICC-IM y ICC-DMP. En la actividad nerviosa inhibitoria, mediada por óxido nítrico (NO), las células intersticiales no sólo actúan como conexión entre terminaciones nerviosas y musculatura lisa, sino que también amplifican la señal inhibitoria. Este proceso es llevado a cabo de la siguiente manera; primero la terminal nerviosa libera NO que hiperpolariza la ICC-IM y acto seguido dicha hiperpolarización es propagada hacia las células musculares lisas, que están eléctricamente acopladas a las ICC-IM (272). La amplificación se produce gracias a que las células intersticiales tienen capacidad de producir NO en respuesta a elevaciones de calcio citosólico. Dicha elevación es lo que tiene lugar, al contrario de lo que ocurre con las células musculares, cuando el NO actúa sobre las ICC-IM (272-274).



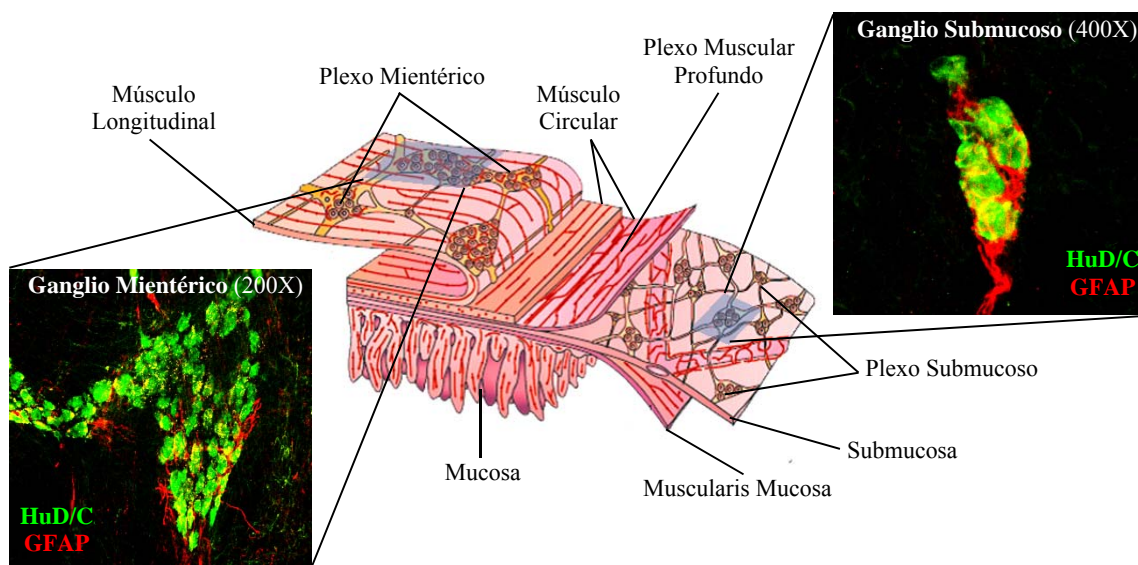
Papel intermediario de las ICC en la inervación del músculo gastrointestinal. (ACh – Acetilcolina; AChE – Acetilcolinesterasa; ATP – Adenosin Trifosfato; NO Óxido nítrico; SP – Sustancia P; VIP – Péptido intestinal vasoactivo)

El papel de las ICC en la actividad excitadora gastrointestinal consiste en ser dianas de las terminaciones nerviosas colinérgicas. Con este fin, las ICC-IM en el colon (272) y el estómago (275) y las ICC-DMP en el intestino delgado (276;277), poseen gran cantidad de receptores muscarínicos. Esta característica unida al estrecho contacto (Similar a una sinapsis interneuronal) existente entre terminaciones nerviosas y ICC posibilita que las células intersticiales respondan adecuadamente a los estímulos y posteriormente sean transmitidos a las

células musculares lisas a través del acoplamiento eléctrico. Cabe mencionar que las células musculares también poseen receptores muscarínicos, pero se encuentran demasiado alejadas de las terminaciones nerviosas, por lo que las concentraciones de acetilcolina que les llegan no son efectivas (275).

SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO EN EL COLON.

El sistema nervioso entérico (SNE) es la mayor subdivisión del sistema nervioso autónomo. Controla las principales funciones del tracto gastrointestinal, constituyendo la inervación primaria del músculo liso, las células epiteliales y, en menor medida, de los vasos sanguíneos intramurales, células enteroendocrinas y el tejido linfoide. Neuronas procedentes de los sistemas simpático y parasimpático modulan sus funciones en gran medida a través de sinapsis con los ganglios del SNE o directamente inervando los tejidos efectores (278).



Localización histológica de los plexos nerviosos entéricos. Las imágenes situadas a ambos lados de la ilustración corresponden a ganglios nerviosos de colon humano marcados con los anticuerpos HuD/C y GFAP, lo que permite la localización de cuerpos neuronales y células gliales, respectivamente (Composición realizada con ilustración de Furness JB. *The enteric nervous system and neurogastroenterology. Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012 May;9(5):286-94 e imágenes confocales obtenidas en el departamento de Fisiología de la Facultad de Enfermería de la Universidad de Extremadura (Cáceres))

Estructura del sistema nervioso entérico

Los cuerpos neuronales del ENS se encuentran localizados en dos extensas redes que se extienden por todo el tracto gastrointestinal: El plexo mientérico y el plexo submucoso. Este último se encuentra en el tejido conectivo de la capa submucosa, mientras que el mientérico reside entre las dos capas de músculo liso de la pared colónica. En el colon humano, el plexo mientérico está compuesto por ganglios irregulares de morfología estrellada que contienen entre 60-80 cuerpos neuronales cada uno y un número de 6 a 7 veces mayor de células gliales (279). Estos ganglios y sus conexiones directas entre ellos constituyen el plexo mientérico primario, pero también emiten proyecciones hacia el músculo liso y la submucosa y hacia la capa de músculo longitudinal, considerándose éstas los plexos mientéricos secundario (O plexo muscular profundo) y terciario respectivamente (203).

El plexo submucoso humano consiste en realidad en diferentes capas neuronales conectadas entre sí. La capa más próxima a la mucosa es el plexo de Meissner y la más cercana al músculo circular es el plexo de Henle. Algunos autores describen también la presencia incluso de otro plexo intermedio (280;281). En cuanto a su función, existen evidencias que apuntan a que el plexo de Henle emite proyecciones hacia la capa de músculo circular y presumiblemente ejerce un papel en el control de la motilidad (282-284). El plexo de Meissner tiene un mayor número de neuronas que se proyectan hacia la mucosa, fundamentando la posibilidad de que regule aspectos relacionados con la secreción y la actividad vasomotora (281;283).

Tipos neuronales presentes en el sistema nervioso entérico.

Atendiendo a su morfología, las neuronas del SNE son fundamentalmente de tipo Dogiel I y II. En 1895, Dogiel clasificó las neuronas atendiendo a la forma de su cuerpo y la distribución de sus proyecciones, describiendo los tipos Dogiel I, II y III (285). Posteriormente se han añadido más tipos a esta clasificación, hasta nueve, manteniendo la denominación Dogiel (286). Las células nerviosas del tipo I se caracterizan por tener un gran cuerpo estrellado, de forma aplanada y de 4 a 20 dendritas de escasa longitud que terminan muy cerca del cuerpo neuronal. Su axón es largo y pasa a través de varios ganglios antes de contactar con su efector (287). Las neuronas tipo II tienen un cuerpo oval y menos dendritas que las anteriores, pero más largas. Su axón es también más largo y suele llegar hasta el plexo submucoso (288).

En cuanto a sus características electrofisiológicas, existen dos tipos de células nerviosas en el SNE: Neuronas AH y neuronas S. Haciendo referencia al párrafo anterior, las neuronas AH tienen morfología Dogiel II, mientras que las S son del tipo I (209;289). Las neuronas AH son fundamentalmente interneuronas conectadas en circuitos de retroalimentación positiva localizados en el plexo mientérico, siguiendo el eje del músculo circular a lo largo de un segmento intestinal 150/151/152. Estas células emiten una de sus dendritas en dirección a la mucosa, donde a través de receptores 5HT₃, son capaces de detectar la serotonina liberada por las células enterocromafines en respuesta a la presencia de contenido intestinal 153. El alto grado de interconexión existente entre esta población neural hace que una vez sobrepasado el umbral de excitación en una de ellas, el estímulo llegue rápidamente a múltiples neuronas motoras musculares, secretomotoras y vasomotoras, dando lugar a una respuesta rápida y

coordinada sincronizando las secreciones digestivas con los patrones motores 14. Lo que caracteriza especialmente a estas neuronas es su potencial de reposo, más electronegativo que el de las S, hecho que determina su baja excitabilidad. Cuando un estímulo supera este umbral, desencadena un potencial de acción característico con 4 fases diferenciadas: Una fase de despolarización consecuencia de la apertura de canales inespecíficos para Ca^{2+} y Na^+ , una repolarización lenta provocada por la apertura de canales de calcio voltaje dependientes tipo N, que determina una especie de meseta, una hiperpolarización temprana debida a la apertura de canales de K^+ tipo *delayed rectifier* y por último, su fase más característica, una hiperpolarización tardía. Esta última fase, que da nombre a este grupo de neuronas (AH, *after hyperpolarization*), es mediada por canales de K^+ de alta conductancia activados por calcio. Su duración, que oscila entre los 2 y los 25s, determina un largo periodo refractario que a su vez implica una baja frecuencia de emisión de potenciales de acción (209;289). Sinapsis excitadoras o algunos agentes paracrinicos, pueden hacer desaparecer la fase de hiperpolarización tardía y en consecuencia aumentar la excitabilidad neuronal y la frecuencia de emisión de potenciales de acción 168. Por otro lado, las neuronas tipo S tienen un potencial menos electronegativo, lo que les hace más excitables. Sus potenciales de acción son menos intensos que los de las neuronas AH y nunca presentan la fase de hiperpolarización tardía. La despolarización en estas células es totalmente dependiente de los canales de Na^+ , con lo que al contrario de lo que ocurre con el tipo anterior, sus potenciales de acción son totalmente abolidos por tetrodotoxina (289). La distribución de estos dos tipos neuronales no es homogénea en todo el tracto gastrointestinal, de hecho las neuronas AH están sólo en el intestino delgado y grueso, mientras que las S aparecen en el todo el tubo digestivo, vesícula biliar y páncreas (209).

En cuanto a su función, pueden diferenciarse tres grupos de neuronas: Neuronas sensitivas, neuronas motoras e interneuronas. Sin embargo, esta clasificación es difícilmente aplicable a algunas células nerviosas presentes en el ENS, ya que desarrollan características propias de los tres grupos. Dichas células son las neuronas aferentes primarias intrínsecas, o IPANs por sus siglas en inglés. Estas neuronas tipo Dogiel II son sensibles a estímulos mecánicos y químicos, pueden ser excitadas por potenciales sinápticos lentos, respondiendo con largas salvas de potenciales de acción, y también median la respuesta secretora de la mucosa (290). Es por ello que forman un grupo aparte dentro de las neuronas sensitivas, como se describe más adelante en el texto.

Motoneuronas.

A lo largo del intestino, son aquellas que comúnmente actúan como neuronas efectoras finales, innervando entre otros al músculo liso intestinal, a los vasos sanguíneos (Vasomotoras) o al epitelio (Secretomotoras). Son de especial importancia las motoneuronas que controlan la motilidad de la capa de músculo liso. Estas células nerviosas pueden tener un carácter excitador o inhibitor. Las neuronas excitadoras entéricas son fundamentalmente colinérgicas y generalmente, también poseen taquikinas (291;292). Los axones de estas neuronas se proyectan en mayor medida en sentido oral y una vez dentro de la capa de músculo circular discurren paralelos a las fibras musculares durante algunos milímetros. Los trayectos intramusculares de estos axones desarrollan múltiples varicosidades desde las que liberan sus

neurotransmisores (203;208). Por otro lado, las motoneuronas inhibitoras proyectan sus axones entre 1 y 10 milímetros aboralmente antes de que éstos contacten con el músculo circular. Una vez allí, se extienden entre las fibras musculares, liberando una amplia variedad de sustancias inhibitoras de la contractilidad del músculo liso. Entre estas sustancias se incluyen el óxido nítrico (NO), péptido intestinal vasoactivo (VIP), péptido activador de la adenilato ciclasa (Pituitaria) (PACAP), adenosín trifosfato (ATP) o nicotinamida adenin dinucleótido (NAD⁺) (293;294). Esta polaridad en la inervación motora del músculo circular está descrita en diferentes partes del intestino, incluyendo el colon humano (291) y en diferentes especies (295-299). En el caso del músculo longitudinal, el fenómeno es diferente, dado que las motoneuronas excitadoras no muestran una polarización marcada (299;300) y las inhibitoras dirigen sus axones en sentido aboral, al contrario de lo observado para el músculo circular (300). Es un hecho ampliamente descrito que cada una de las capas musculares se encuentra inervada por diferentes poblaciones neuronales (291;301).

Interneuronas.

La presencia de reflejos intrínsecos polarizados en el intestino requiere de la conexión de zonas distantes entre sí. Para ello no es suficiente con la disposición anteriormente expuesta de las motoneuronas, son necesarias otro tipo de células nerviosas que juegan un papel muy importante en el control de la motilidad; las interneuronas. Estas células se dividen funcionalmente en interneuronas ascendentes y descendentes. En el intestino delgado de cobaya ha sido descrito un solo tipo de interneuronas ascendentes. Sus proyecciones son relativamente cortas (15mm) y el neurotransmisor predominante en ellas es la acetilcolina, aunque también presentan taquikininas (297). Dichas interneuronas se agrupan haciendo sinapsis con otras del mismo tipo para dar lugar a cadenas que se prolongan por el intestino, posibilitando que estímulos en una zona desencadenen reflejos en regiones más allá de las inervadas por las motoneuronas de la zona. En el colon, estudios realizados por Lomax y Furness en el 2000 apuntan a la existencia de más de una clase de interneuronas ascendentes (302).

Las interneuronas descendentes son más numerosas y generan circuitos de mayor longitud que las ascendentes. También se diferencian de éstas en que a pesar de ser mayoritariamente colinérgicas, presentan co-neurotransmisores y moduladores. Estudios en intestino delgado de cobaya han descrito cuatro tipos de interneuronas descendentes en función de su inmunoreactividad para serotonina, somatostatina y VIP, este último tipo, a su vez, con o sin óxido nítrico sintasa (303). En el caso del colon humano existen al menos tres clases de interneuronas descendentes: colinérgicas, nitrérgicas (304) y serotoninérgicas (305).

Neuronas Aferentes Intrínsecas Primarias (IPANs)

Desde los primeros estudios de los reflejos intestinales se exponía la necesidad de que existieran terminaciones nerviosas sensibles a la distensión, la presión o los estímulos químicos (306;307). Desde entonces, numerosos estudios han ido poniendo de manifiesto su existencia (308;309) y caracterizando sus aspectos fundamentales. Actualmente se conoce que las IPANs no reciben la inervación colinérgica característica de la mayoría de las neuronas entéricas (310)

y que mayoritariamente tienen una morfología consistente en un gran cuerpo celular rodeado de múltiples axones (Tipo Dogiel II) (311). En el intestino delgado de cobaya, las neuronas Dogiel II son mecánicas y quimiosensibles (312;313) y se caracterizan por largas hiperpolarizaciones tras los potenciales de acción (314). También se ha descrito que pueden ser estimuladas por sustancias como la serotonina o el ATP, liberados por las células enteroendocrinas o enterocromafines (315-318). Las proyecciones de estas células nerviosas se extienden profusamente entre los ganglios mientéricos haciendo sinapsis con otras neuronas Dogiel II y también con otros tipos (319-321). En el plexo submucoso también hay descritas neuronas con esta morfología, si bien esta población neuronal es predominantemente sensible a estímulos mecánicos. En el tracto gastrointestinal de cobaya, las células Dogiel tipo II suponen un 30% de las neuronas del intestino delgado (303) mientras que en el colon sólo representan el 8% (302). La amplia red que conforman junto con el alto grado de interconexión que tienen entre sí hace muy probable que este conjunto de neuronas puedan activarse conjuntamente y determinar el umbral requerido para la puesta en marcha de patrones motores específicos (322). Este papel ha sido demostrado por Bayguinov et al. En el colon de ratón, registrando movimientos de calcio en neuronas durante los complejos mioeléctricos migradores colónicos (323). En el caso de la especie humana, está descrito que las neuronas con morfología tipo Dogiel II constituyen el 10% de las neuronas mientéricas del intestino delgado (324), pero en el caso del colon, aún no existen datos sobre esta proporción.

Otras clases de neuronas entéricas.

Además de las hasta ahora descritas, existen otras neuronas en tracto gastrointestinal que realizan funciones colaterales. En este grupo se incluyen las neuronas secretomotoras y vasomotoras, que además hacen sinapsis con otros cuerpos neuronales (325) y pueden llegar a tener influencia sobre algunos circuitos motores. En concreto, un tipo específico de neuronas, las neuronas viscerofugales, juegan un papel importante en la coordinación de reflejos motores. Estas células salen fuera del intestino y hacen sinapsis con neuronas simpáticas postganglionares en los ganglios prevertebrales, influyendo en las acciones secretoras y motoras de estas neuronas, pero sin pasar por el sistema nervioso central (326;327). Parecen estar involucradas en la activación de reflejos extrínsecos coordinando diferentes regiones del intestino, como el reflejo inhibitorio rectocolónico (328;329), mediado a través de circuitos simpáticos adrenérgicos (330).

Inervación simpática y parasimpática en el colon.

Las terminaciones del sistema nervioso simpático proceden tanto de los ganglios prevertebrales como de la cadena paravertebral, si bien estas últimas se encargan fundamentalmente de inervar vasos sanguíneos. Los directamente implicados en la motilidad son los nervios procedentes de los ganglios prevertebrales, concretamente del ganglio hipogástrico superior, del que salen los nervios colónicos lumbares para inervar el colon (331). El neurotransmisor principal en esta vía es la noradrenalina, aunque la mayoría de las terminaciones nerviosas son también positivas para tirosina hidroxilasa (TH) y muchas de ellas contienen neuropéptidos, particularmente neuropéptido Y (NPY), galanina o somatostatina

(332). Estas terminaciones simpáticas inervan vasos sanguíneos, tanto intrínsecos como extrínsecos, y ganglios nerviosos mientéricos y submucosos. También llegan a la mucosa y a la capa muscular, aunque en menor medida, salvo en el caso de los esfínteres, donde la inervación simpática es especialmente densa (203). En estudios llevados a cabo en intestino delgado de cobaya se ha descrito que las neuronas simpáticas que inervan vasos sanguíneos contienen TH y NPY; que las que inervan los ganglios submucosos contienen TH y somatostatina y que las que hacen sinapsis con los ganglios mientéricos solo presentan TH (333). El sistema nervioso simpático actúa a dos niveles en el colon: en primer lugar existe una inhibición tónica de la secreción colónica mediada a través de receptores adrenérgicos tipo α_2 , como demuestra el aumento en la secreción que se observa al interrumpir las aferencias simpáticas. En segundo lugar, su activación provoca la contracción de los esfínteres y la disminución de la liberación de acetilcolina por las neuronas mientéricas, lo que conjuntamente conlleva una disminución en el tránsito colónico (332). Los estudios *in vitro* en animales demuestran que es mayor el efecto sobre las secreciones que el observado en la motilidad, sin embargo la administración de yohimbina, un antagonista de los receptores α_2 , en humanos produce un aumento del tono y la sensibilidad en el colon, demostrando la presencia de un tono simpático inhibitor de la motilidad colónica (334).

El origen de la inervación parasimpática es distinto para el colon derecho e izquierdo. El nervio vago se encarga de inervar ciego, colon ascendente y colon transversal. Sus axones pasan por el plexo hipogástrico superior y caminan paralelos a los axones simpáticos hasta llegar al colon derecho. El colon izquierdo recibe inervación de las raíces sacras S2-4 a través del plexo pélvico y también de terminaciones provenientes del plexo hipogástrico inferior que pasan a través del plexo mesentérico inferior. Tras penetrar en el colon, estas fibras parasimpáticas dan lugar a filamentos gruesos llamados nervios ascendentes colónicos, que inervan una parte importante del colon izquierdo (335-337). Primariamente hacen sinapsis excitadoras con neuronas mientéricas a través de receptores nicotínicos, pero su efecto neto final (Excitador o inhibitor) depende del carácter de la población neuronal sobre la que hagan sinapsis (338). Son especialmente importantes en la propulsión fecal las vías parasimpáticas excitadoras, ya que un daño en ellas genera una constipación severa (339).

Vías aferentes extrínsecas.

Las neuronas aferentes primarias extrínsecas tienen sus cuerpos neuronales fuera del colon. En el caso de las pertenecientes al sistema parasimpático, sus somas se encuentran en los ganglios nodoso y yugular del nervio Vago, proyectando sus axones hasta las regiones proximales del colon. No se conoce con exactitud la función de esta vía, pero parece claro que no interviene especialmente en la percepción del dolor en el colon (203).

En el caso de las neuronas aferentes espinales, cuyos somas están en los ganglios de las raíces dorsales lumbares y sacras, extienden sus proyecciones se por todo el colon. Los axones de las neuronas procedentes de la región lumbar viajan por los nervios espláncnicos, pasan a través del ganglio mesentérico inferior y llegan a colon y recto por los nervios colónicos lumbares, donde emiten terminaciones sensitivas a todas las capas de la pared intestinal. Las

neuronas presentes en los ganglios sacros emiten sus proyecciones a través de los nervios pélvicos atravesando el plexo pélvico en su trayecto hacia colon y recto. Un porcentaje de estas últimas, constituyen una población neuronal diferente de las células nerviosas originadas en los segmentos lumbares, codificando distintos tipos de información, especialmente de la región rectal (298). Estas aferencias sacras presentan un umbral de excitación bajo y un amplio rango de sensibilidad mecánica, lo que indica su participación en fenómenos graduales como la percepción del llenado rectal o la activación del reflejo defecatorio (340). Por el contrario, las neuronas de las raíces lumbares y un porcentaje de las sacras, tienen umbrales de excitación altos y participan en la nocicepción en todas las regiones del colon y el recto (341). En casos de inflamación de la pared intestinal, la sensibilidad de estas terminaciones aumenta en gran medida (342;343).

Transmisión nerviosa en el sistema nervioso entérico.

El potencial de reposo de una neurona varía cuando recibe una sinapsis, dando lugar a potenciales postsinápticos excitadores (EPSP *Excitatory Postsynaptic Potentials*) o inhibidores (IPSP, *Inhibitory Postsynaptic Potential*). En el caso de los ESPS pueden ser rápidos (fESPS, *fast ESPS*) o lentos (sESPS, *slow ESPS*) (289). Los fESPS tienen lugar exclusivamente en neuronas de tipo S, su duración es menor de 50ms y provocan un cambio de amplitud variable en el potencial de membrana, que da lugar a un potencial de acción. Los neurotransmisores responsables de este fenómeno son la ACh, la serotonina y el ATP, actuando a través de receptores nicotínicos, 5HT₃ y P2X, respectivamente (344;345). Los sESPS se dan en todas las neuronas AH y un 70% de las S, perdurando por un periodo de entre 15 y 120s. En este caso, los neurotransmisores responsables son la ACh, vía receptores muscarínicos, y la sustancia P, ambos liberados por neuronas AH que hacen sinapsis bien con otras AH o bien con neuronas S (209). Durante el sESPS, se produce fundamentalmente un cierre de los canales de alta conductancia para el potasio (BK), lo que da lugar a un aumento en la excitabilidad por reducción o eliminación de la fase de hiperpolarización tardía, reduciendo así el periodo refractario (346). En estas condiciones, la neurona emite potenciales de acción continuamente hasta que termina el sESPS, generando efectos prolongados sobre otras neuronas o sobre sus efectores. Para modular fESPS y sESPS, en el SNE existen fenómenos de facilitación e inhibición sináptica mediados por la acción de neurotransmisores sobre receptores presinápticos. La inhibición sináptica tiene lugar tanto en fESPS como en sESPS, disminuyendo la liberación de ACh por estimulación de receptores presinápticos α -adrenérgicos (347). La facilitación es típica en los fESPS; en este caso el neurotransmisor o agente paracrino que actúa sobre el receptor presináptico, induce un aumento en la cantidad de neurotransmisor liberado por la terminal nerviosa (289;348).

La conexión entre las motoneuronas musculares del SNE y el músculo liso intestinal tiene lugar en las llamadas uniones neuromusculares. En ellas, menos complejas que las placas terminales del músculo esquelético, se posibilita que el neurotransmisor liberado por las varicosidades de las terminales nerviosas llegue a las ICCs, a las células musculares y a otros elementos celulares moduladores de la respuesta motora intestinal (207;349). Estos neurotransmisores pueden dar lugar en los miocitos tanto a contracciones como relajaciones,

bien por acoplamiento electromecánico; a través de cambios en el potencial de membrana, o bien por acoplamiento farmacomecánico, mediante la activación de cascadas intracelulares que darán lugar a cambios mecánicos independientes del potencial de membrana celular (209). En el caso del acoplamiento electromecánico, el efecto producido por neurotransmisores excitadores y que da lugar a contracción, se denomina potencial de unión excitador, (*EJP, excitatory junction potential*), mientras que el caso contrario, que conlleva relajación muscular, se llama potencial de unión inhibidor (*IJP, inhibitory junction potential*). Los neurotransmisores responsables de provocar EJPs son la ACh y la sustancia P, mientras que los IJP son fundamentalmente provocados por NO y VIP. El acoplamiento electromecánico desencadena sus efectos principalmente por regulación de la $[Ca^{2+}]_i$, aunque también puede actuar sobre la actividad de la cinasa o la fosfatasa de la cadena ligera de miosina, alterando el estado contráctil de la célula de forma independiente al calcio (209;350).

CONTROL MOTOR DEL COLON.

La integración coordinada de los componentes implicados en la motilidad descritos hasta ahora, da lugar al establecimiento de distintos patrones motores que posibilitan un correcto funcionamiento del colon. El control de la motilidad del colon constituye uno de los aspectos más importantes de su fisiología, puesto que regula el contacto del contenido colónico con la flora bacteriana y sobre todo porque es la encargada de posibilitar el almacenaje de las heces y regular de forma adecuada su expulsión (209).

Regulación intrínseca.

Reflejos motores locales.

Dentro de la actividad motora colónica se pueden distinguir dos tipos de movimiento, los movimientos de mezclado, también llamados de segmentación, y los movimientos de propulsión. En el hombre, la propulsión del contenido colónico depende fundamentalmente de movimientos en masa, en especial de las contracciones propagadas de alta amplitud (*HAPC High Amplitude Propagating Contractions*) (351) que son debidas a la aparición de potenciales en salva de larga duración cuyo origen parece estar en las MPO (352). Las HASP ocurren con una frecuencia media de 10 al día, generalmente relacionadas con el despertar, las comidas y también previas a la defecación (353). El elemento desencadenante es la distensión de las paredes del colon y su frecuencia se ve incrementada en casos de diarrea (354). Dichas contracciones suelen originarse en el colon ascendente y originan un movimiento de avance de gran cantidad de material intraluminal (351). El mecanismo fisiológico que subyace en la propagación de este patrón es el reflejo peristáltico, un reflejo polisináptico que genera una respuesta estereotipada al estirarse la pared intestinal o ante la presencia de determinados estímulos químicos en la mucosa (355). En este reflejo, los mecanismos básicos activados son la contracción del músculo liso circular y longitudinal en sentido oral al estímulo y la relajación del músculo circular y contracción del longitudinal en sentido aboral, lo que supone el avance del contenido desde el segmento que se contrae hasta el que se encuentra en fase receptiva (356). El

circuito neuronal en el que se asienta este reflejo está compuesto por el circuito reverberante de las neuronas AH, por interneuronas ascendentes y descendentes y por motoneuronas de la zona oral y aboral a la que capta el estímulo. Cuando las neuronas AH se estimulan, activan interneuronas ascendentes que, a su vez, inhiben a las motoneuronas inhibitorias de la capa de músculo y excitan a las motoneuronas excitadoras de esta misma capa. También se activan las interneuronas ascendentes que excitan las motoneuronas del músculo longitudinal. Estos dos mecanismos determinan la contracción circunferencial del colon que propulsa el contenido en sentido aboral. La propulsión se ve favorecida por el otro aspecto del reflejo peristáltico, la relajación del segmento que recibe el flujo. En este caso, la activación de las interneuronas descendentes da lugar a la inhibición de motoneuronas excitadoras del músculo circular, conjuntamente a la activación de motoneuronas excitadoras del músculo longitudinal. Ambas acciones conllevan un aumento de la luz del tramo receptor. Estos circuitos, residentes en el plexo mientérico, se repiten a lo largo de todo el órgano y las sinapsis excitadoras entre ellos permiten la propulsión del contenido intestinal (209;355).

El otro tipo de movimiento fundamental en la motilidad del colon son los movimientos de segmentación o de mezcla. Estos movimientos se caracterizan por contracciones de baja amplitud, a veces simultáneas en varios segmentos, a veces con sentido peristáltico y antiperistáltico a lo largo de varios segmentos, que no ocluyen la luz colónica y cuyo sentido fisiológico parece corresponder a un mezclado y facilitación de la digestión bacteriana y la absorción colónica (357). Da lugar tanto a avances como a un flujo retrógrado en el contenido intestinal, pero su efecto final es un enlentecimiento del tránsito a lo largo del colon. El circuito neural básico descrito para el caso de los movimientos de propulsión, también hace posibles los movimientos de segmentación. En este caso, en vez de producirse una propagación en sentido aboral del estímulo, lo que acontecen son ciclos alternos de contracción y relajación en segmentos contiguos. De este modo no se produce la propagación, sino la mezcla del contenido intestinal con las secreciones digestivas, que también se estimulan de forma refleja (203;358).

Además de los reflejos motores que desencadenan fenómenos contráctiles en el colon, existen también circuitos que dan lugar a respuestas vasomotoras y secretomotoras. En ambos casos, las neuronas encargadas de desencadenar el proceso son las IPAN, detectando cambios tanto mecánicos (Distensión de la pared o deformación de la mucosa) como químicos (Contenido intestinal) (359). En concreto, en la especie humana, las motoneuronas que actúan sobre la mucosa y las arteriolas tienen ACh y VIP como neurotransmisores. Esta combinación asegura que los reflejos locales secretores vayan acompañados de una respuesta vasodilatadora que asegure un adecuado aporte de nutrientes y electrolitos a la zona. Junto con este arco reflejo, tiene lugar otro en el que los potenciales de acción de las IPAN se transmiten a neuronas colaterales dendríticas, hasta alcanzar otros puntos de la mucosa, liberando ACh y taquikinas (360). Estos dos arcos reflejos se coordinan entre sí para mantener una adecuada tasa de absorción y secreción colónica, acompañada de suficiente aporte sanguíneo (361).

Complejos motores migradores colónicos (CMMC Colonic Migrating Motor Complexes)

Estos patrones organizados han sido observados en numerosas especies, pero no en la especie humana. Ya en 1973, Wood registró unas contracciones de larga duración que se extendían por toda la longitud del colon de ratón in vitro, a las que llamó ondas peristálticas (362). En la actualidad se les denomina CMMCs y se conoce también que son debidos a complejos mioeléctricos migradores (363;364). También se ha demostrado que su propagación depende únicamente de la integridad de la red neural del colon, como se demuestra en el estudio de Powell et al, en el que los CMMCs pueden propagarse a través de segmentos en los que se han bloqueado los canales de calcio tipo L, pero no ocurre así cuando se bloquean los canales de sodio de las neuronas (365). Su intervalo de aparición en el ratón es de 2 a 4 minutos y su duración aproximada es de 30 segundos, siendo por tanto más largos y menos frecuentes que las ondas lentas (365).

Reflejos motores distantes.

La distensión de otras partes del tracto gastrointestinal o la presencia de determinados nutrientes influencia también la motilidad del colon. Por ejemplo, si existe una distensión en el íleon se produce de forma refleja una relajación del colon y viceversa; si en el colon hay distensión, se reduce el tránsito ileal y se interrumpen las ondas lentas en esta zona (366). Este reflejo ileocólico está mediado por vías simpáticas a través de los nervios esplácnicos (367). Encontramos otra influencia similar, pero determinada por nutrientes, en el llamado “freno colónico”; en este fenómeno la presencia de lactosa o ácidos grasos de cadena corta en el colon disminuyen el tono del estómago (368). También son de vital importancia las influencias colorrectales, posibilitando una adecuada función defecatoria. Esta relación consiste en que la distensión en la unión rectosigmoidea incrementa la presión del recto y relaja el ano (369), desencadenando la defecación. Por el contrario, la distensión el colon sigmoide da lugar a un aumento en la presión de la unión rectosigmoidea, facilitando la retención de heces (370). Por último, dentro del propio colon tienen lugar reflejos que comprenden regiones muy distantes entre sí. La distensión de regiones distales del colon tiene como consecuencia una reducción de la motilidad del colon proximal, mediada por vías dependientes de la activación de receptores α_2 -adrenérgicos (330).

Regulación extrínseca.

Además de los reflejos desencadenados por la acción directa de distintos estímulos sobre el colon, existen mecanismos por los cuales la motilidad colónica se adapta a fenómenos que tienen lugar en otras localizaciones orgánicas. Así el colon modula su función acorde a la ingesta de alimento, al estado de vigilia, al nivel de estrés y al sistema inmune.

El reflejo gastrocolónico es como se conoce al mecanismo por el cual el colon responde a la distensión gástrica que origina la ingesta de alimento. Este reflejo está mediado por mecanorreceptores y en menor medida por quimiorreceptores que detectan la presencia de nutrientes en el intestino delgado (371). Ambas vías están parcialmente mediadas por activación de receptores 5HT₃ (372). La respuesta del colon a este reflejo consiste en un aumento de su actividad, especialmente en el colon sigmoide (373).

El estado de vigilia influye también sobre la motilidad colónica. Durante la aparición de ondas lentas en el encefalograma (Fase 3 del sueño) se abolen todos los movimientos propagados del colon. En general, cuanto más profundo es el sueño, mayor es la inhibición de la motilidad colónica, sin embargo, en la fase REM (*Rapid Eyes Movement*) se vuelve a valores similares a los obtenidos durante la fase 2 del sueño (374). Al despertar, tiene lugar un incremento en la actividad del colon tanto en los fenómenos propagados como en los que afectan a segmentos aislados (353;375).

El estrés afecta también a los movimientos del colon, incluso distintos tipos de estrés causan diferentes alteraciones en este órgano. Así, el estrés psicológico genera un aumento en las contracciones propagadas, mientras que el estrés de tipo físico produce contracciones simultáneas a lo largo del colon (376). También se ha observado que distintas regiones del colon reaccionan de forma distinta ante el mismo agente estresante, como queda reflejado en un estudio en el que ratas sometidas golpes en la cola experimentaban una disminución en las contracciones de larga duración (LDC) del colon proximal, mientras que aumentaba la tasa de expulsión de heces en el colon distal (377).

Los efectos que las alteraciones inmunológicas pueden ocasionar son muy variados, desde incrementos en la actividad mioeléctrica, como ocurre en el caso de las alergias alimentarias (378), hasta la disminución del tránsito gastrointestinal observada en infecciones por *Schistosoma mansoni* (379). Al menos en el caso de las alergias, está probada la importancia de las fibras sensitivas, como demuestra el efecto de la capsaicina para prevenir los efectos de la exposición a antígenos en animales sensibilizados (380).

FARMACOLOGÍA DE LA MOTILIDAD COLÓNICA

Acetilcolina

La ACh ejerce su acción en el tracto gastrointestinal a través de receptores muscarínicos. La proporción de los dos tipos mayoritarios en el colon, M₂ y M₃, es de 4:1. A pesar de ello, los estudios *in vitro* apuntan que los efectos de la ACh en el tracto gastrointestinal son fundamentalmente mediados por receptores M₃ (381;382). En la especie humana, los agonistas muscarínicos y los inhibidores de la AChE aumentan la motilidad colónica, mientras que los antagonistas de estos receptores se usan en el control del dolor abdominal (203). La atropina, un antagonista inespecífico de receptores muscarínicos, causa retraso en el tránsito colónico (383), sin embargo la tolterodina, que también es una antagonista muscarínico inespecífico, no tiene efecto (384). Este hecho puede deberse a una mala unión de la tolterodina a los receptores del intestino o a una diferente afinidad por los distintos subtipos de receptores muscarínicos, ya que los subtipos M₁, M₂ y M₄ son receptores presinápticos que posibilitan la autorregulación de la liberación de ACh (385).

Noradrenalina

El sistema nervioso simpático ejerce una inhibición tónica sobre la motilidad intestinal a través de receptores α_2 -adrenérgicos (334;386). La estimulación de estos receptores produce una inhibición presináptica de la liberación de ACh en el plexo mientérico y en la unión neuromuscular (387), acompañada además de un efecto analgésico por la presencia de estos receptores en las vías nociceptivas espinales y en el cerebro (388). El uso de yohimbina, un antagonista de los receptores α_2 , incrementa la motilidad del colon, mientras la clonidina (Agonista α_2) la reduce (388).

Serotonina

De los siete receptores conocidos para la serotonina, en el tracto gastrointestinal se han descrito cinco de ellos: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ y 5-HT₇ (389). La mayoría de los estudios realizados en humanos se centran en la modulación de los receptores 5-HT₃ y 5-HT₄. En cuanto a los antagonistas de los receptores 5-HT₃, se han desarrollado varios fármacos dirigidos al tratamiento del síndrome de intestino irritable, cuyo efecto sobre el colon consiste en aumentar su capacidad de almacenaje y disminuir su sensibilidad. Lamentablemente, conllevan un aumento significativo del riesgo de colitis isquémica y se usan sólo para pacientes refractarios a otros tratamientos (390). Por otro lado, el desarrollo de agonistas selectivos de los receptores 5-HT₄ va encaminado al tratamiento del estreñimiento crónico, ya que sus efectos consisten en acelerar el tránsito intestinal (391).

Taquikininas

Las taquikininas endógenas, sustancia P, neurokinina A y neurokinina B actúan como neurotransmisores tanto en el sistema nervioso central como periférico. Los receptores que median su acción estimulante de la motilidad son los NK1, NK2 Y NK3, respectivamente (203). La distribución de cada subtipo varía según especies, en el colon humano el más numeroso es el NK2, mientras que en el ratón se observa una participación similar de NK1 y NK2 (392). En el caso del cobaya los efectos mediados por NK2 son los más prominentes (393).

Opioides

El efecto de los opioides en el tracto gastrointestinal consiste en reducir la excitabilidad neuronal, lo que conduce a un aumento de los movimientos no propulsivos y del tono general. También incrementan la absorción de fluidos con lo que unido a lo anterior, el efecto neto es reducción del tránsito y constipación (394). Cuando se administran de forma regular, los opioides pueden ayudar al tratamiento del dolor en el síndrome de intestino irritable, pero no ocurre así si se administran a demanda en función del dolor (395).

Óxido nítrico

Este gas es un potente inhibidor de la contractilidad del músculo liso. En el colon existe un tono inhibitor constante mediado por NO, como demuestran numerosos estudios en los que los inhibidores de la sintasa de NO estimulan la actividad espontánea o la aparición de contracciones propagadas (396). Se ha demostrado en preparaciones in vitro de colon distal de cobaya, que el alargamiento del colon producido por la presencia de contenido fecal induce la liberación de NO en sentido aboral, lo que ralentiza el tránsito y posibilita la acomodación del contenido (397).

EL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso que altera toda la biología de un organismo, desde sus moléculas más básicas, hasta células y órganos, actuando de forma deletérea, progresiva, universal e irreversible. Dichas alteraciones provocan una serie de cambios, como la disminución de la capacidad auditiva y gustativa, la caída del pelo, pérdida de elasticidad en la piel, opacidad del cristalino, incremento del porcentaje de grasa y pérdida del tono muscular (398;399). Sin embargo, si bien estos cambios incrementan la vulnerabilidad ante procesos patológicos, muchos de estos síntomas no conducen necesariamente a la muerte del individuo, a sino que son biomarcadores del paso del tiempo (400).

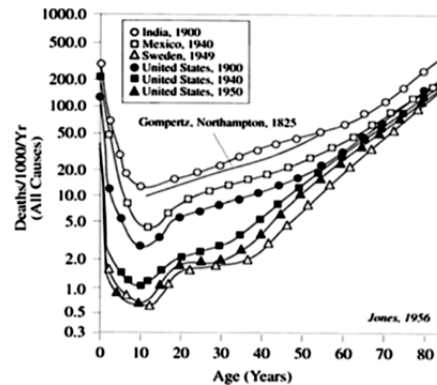
Desde principios del siglo XX, la esperanza de vida en los países desarrollados ha experimentado un aumento de 27 años, lo que equivaldría al incremento experimentado en los anteriores 2000 años de historia (401). Esta ganancia en la expectativa de vida al nacer ha sido fundamentalmente debida a la capacidad de combatir enfermedades infecciosas que anteriormente afectaban a las primeras etapas de la vida y al gran avance en los hábitos de higiene diarios y en la práctica médica (399). Es por ello, que actualmente las enfermedades crónicas como las alteraciones cardio y cerebrovasculares y el cáncer, han sustituido a las enfermedades infecciosas como principal causa de muerte. El aumento más rápido en la esperanza de vida se produjo en los primeros 70 años del pasado siglo, de manera que en los últimos 30 años solo se incrementaron 6 años en la expectativa de vida. Se estima que aunque se consigan resolver todas las causas que provocan muertes hoy en día, la esperanza de vida no podrá alargarse mucho más de 15 años (402). Como contrapunto, evolutivamente una longevidad más allá de la edad de procreación podría ser una desventaja para la especie dando lugar a una competencia por los recursos. Además, el incremento de la longevidad conlleva generalmente una disminución de la calidad de vida, sobre todo en edades avanzadas. En relación con este hecho, desde hace unos años se está acuñando el término “fragilidad”, para referirse al incremento de la vulnerabilidad a estresores producido por una alteración en múltiples e interrelacionados sistemas, que conduce a una disminución en la reserva homeostática y de la capacidad de adaptación del organismo, y lo predispone a eventos adversos para la salud (403).

La esperanza de vida también depende del sexo, así en humanos la esperanza de vida es de tres a cuatro años superior en mujeres, sin embargo la calidad de vida de los hombres es mayor, de tal forma que el 44% de los hombres con 80 años se mantienen robustos e independientes, mientras que para el caso de las mujeres es sólo el 28% (404). En las mujeres alrededor de los cincuenta aparece la menopausia y asociada a ella es muy común la aparición de ciertas enfermedades que disminuyen la calidad de vida. De hecho, la terapia de sustitución hormonal reduce los efectos adversos de la menopausia y protege de la aparición de enfermedades post-menopausia como la enfermedad de Alzheimer (405). Los efectos del envejecimiento sobre el sistema reproductor femenino, son el mejor ejemplo de envejecimiento programado. Sin embargo, existen multitud de síntomas que indican que el envejecimiento es el resultado del deterioro general también debido al ambiente. Tal es el caso de la disminución del filtrado en los riñones, la aparición de enfermedades cardiovasculares, la reducción de masa ósea

y muscular y la pérdida de elasticidad de la piel. Por ello, actualmente está muy aceptado que el envejecimiento es una consecuencia colectiva de factores genéticos y ambientales (400).

TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO.

Ya desde 1825, se conoce que la mortalidad en la especie humana crece de forma exponencial con la edad a partir de la madurez y que alrededor de los ochenta años ésta tendencia disminuye (406). La forma de la gráfica resultante nos lleva a plantearnos las causas del envejecimiento y en este sentido históricamente han existido dos tendencias: las que suponen que el envejecimiento se desarrolla de forma activa, controlado por un programa genético que conduce a la autodestrucción, y las que postulan que el envejecimiento se produce de forma pasiva, debido al cúmulo de errores genéticos y alteraciones en proteínas y lípidos (399;407).



Tasas de mortalidad por edad en la primera mitad del siglo XX (Tomado de Jones, 1956)

TEORÍA DE LOS RADICALES LIBRES.

Esta teoría fue propuesta por Harman en 1956 con el siguiente fundamento: “*El envejecimiento resulta de los efectos nocivos generados por los radicales libres que se producen en el curso del metabolismo celular normal y que son acumulados a lo largo de toda la vida de un organismo*”. De acuerdo con la teoría de Harman, el envejecimiento es consecuencia del acúmulo de radicales libres en las células, debido a una sobreproducción o a una disminución en los mecanismos antioxidantes, que desencadena estrés oxidativo y consecuentemente daño celular (408;409).

Los radicales libres son moléculas inestables caracterizadas por poseer electrones no apareados en su orbital más externo. Dicha inestabilidad hace que reaccionen con otras moléculas convirtiéndolas a su vez en especies reactivas, provocando reacciones en cadena. Las principales especies reactivas de oxígeno son: el oxígeno singlete, el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Además las especies reactivas de nitrógeno como el óxido nítrico y el anión peroxinitrito también tienen efectos perjudiciales sobre la célula.

Los radicales libres pueden provenir tanto de fuentes metabólicas endógenas como de agresiones externas. Puesto que los radicales libres son compuestos muy dañinos para la célula, ésta posee mecanismos de protección frente a los agentes oxidantes generados como la enzima superóxido dismutasa, que reduce los niveles del anión superóxido, la catalasa que cataboliza el agua oxigenada generada por la superóxido dismutasa y el sistema glutatión que detoxifica la célula de agua oxigenada. Las principales dianas para las especies reactivas son: lípidos los

cuales sufren peroxidación lipídica, proteínas donde la oxidación proteica provoca una inactivación funcional y una mayor susceptibilidad a proteasas, hidratos de carbono cuya oxidación produce especies reactivas que desestabilizan a otras proteínas y por último, ácidos nucleicos los cuales pueden sufrir mutaciones y alteraciones estructurales, quedando inutilizados. Las mutaciones provocadas por los radicales libres son una de las causas más importantes del envejecimiento y de la transformación maligna de diferentes células (410-412). Aunque esta teoría ha sido ampliamente discutida debido a los resultados contradictorios de los estudios genéticos y a la baja efectividad de los tratamientos con antioxidantes (413), la teoría de los radicales libres como inductores del envejecimiento está bastante aceptada puesto que una gran cantidad de evidencias experimentales la apoyan (414;415). Uno de sus principales sustentos es el hecho de que la restricción calórica (La manipulación más efectiva para prolongar la esperanza de vida) disminuye la producción de radicales y el daño oxidativo en los ácidos nucleicos (416).

TEORÍA MITOCONDRIAL DEL ENVEJECIMIENTO.

Esta corriente postula que los radicales libres producidos por la mitocondria conducen a daño en el ADN mitocondrial y sobre la propia organela, induciendo la pérdida de la función mitocondrial y consecuentemente, una alteración de la fuente de energía celular (417;418).

Las mitocondrias son orgánulos celulares que generan aeróbicamente energía en forma de ATP utilizando la cadena de transporte de electrones y las enzimas encargadas de la síntesis de ATP. La cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria está formada por cuatro complejos intercomunicados por la coenzima Q y el citocromo C. El paso de electrones desde el O_2 hasta el H_2O provoca un bombeo de H^+ que genera un gradiente electroquímico utilizado para la síntesis de ATP, en un proceso que se denomina fosforilación oxidativa. La ruptura o desacoplamiento de la cadena respiratoria conlleva una producción de especies reactivas. De hecho, el envejecimiento está asociado con un incremento en la producción de anión superóxido por parte de la cadena respiratoria y una disminución de la fosforilación oxidativa (419). La producción de radicales libres por la cadena de transporte de electrones puede dar lugar a un proceso de retroalimentación positiva, ya que las mismas especies reactivas alteran a la propia cadena y la hacen más inefectiva. Para contrarrestar este fenómeno, la mitocondria posee mecanismos de defensa frente al exceso de radicales libres como son la coenzima Q (420) y su propio ADN, que codifica para los diferentes miembros de la cadena de transporte de electrones (421). Sin embargo, ante un estrés oxidativo excesivo estos mecanismos de defensa resultan inefectivos y consecuentemente el aporte energético se frena. Está ampliamente aceptado que dichos mecanismos de defensa no son muy efectivos, ya que el ADN mitocondrial no está muy protegido al no poseer histonas y ser las enzimas reparadoras de dicho ADN menos efectivas que las nucleares (422). Además, se ha descrito que con la edad disminuye la cantidad de coenzima Q (423).

La acumulación de mitocondrias dañadas es un signo de envejecimiento celular. Este fenómeno está fundamentalmente determinado por una menor degradación de las mitocondrias dañadas más que por un incremento en el daño mitocondrial. Así mismo, la velocidad de

división celular está relacionada inversamente con el acumulo de mitocondrias dañadas, ya que tras una división celular los lípidos de la membrana mitocondrial son sintetizados de nuevo. De cualquier modo, este planteamiento sólo es aplicable al daño asociado a la membrana y no al ADN mitocondrial (424).

A su vez, la mitocondria participa en los fenómenos de apoptosis o muerte celular programada, que se inducen por una sobrecarga de calcio en la mitocondria. Ésta provoca la apertura del poro de transición mitocondrial y la salida de citocromo C desde la mitocondria al citoplasma, evento que inicia la destrucción celular por las enzimas caspasas (425). Actualmente existe mucha controversia sobre si esta teoría es o no una teoría distinta de la de los radicales libres.

TEORÍA BASADA EN LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS.

Dicha teoría se basa en que los telómeros son el reloj biológico que conduce al envejecimiento provocado por el acortamiento de los mismos. Los telómeros son fragmentos de ADN de alrededor 10000 pares de bases compuestos por determinadas repeticiones localizadas en los extremos de los cromosomas. La longitud de los telómeros va disminuyendo a lo largo de las divisiones celulares debido a que los cromosomas se separan antes de su replicación total, provocándose así un acortamiento de los mismos. En humanos, durante los primeros nueve meses de vida, la longitud de los telómeros se reduce hasta la mitad debido al gran número de divisiones celulares que se producen en ese periodo de la vida. Es entonces cuando disminuye el número de divisiones y consecuentemente la velocidad de acortamiento de los telómeros (426). De hecho, cuando experimentalmente se activa la enzima telomerasa (encargada de elongar los telómeros) esa relación entre envejecimiento y acortamiento de los telómeros desaparece (427) llegándose incluso a retrasar la aparición del envejecimiento (428). La desaparición de la protección de los cromosomas por los telómeros provoca la pérdida de genes. Además la presencia de cromosomas desnudos provoca la conexión entre cromosomas y aumenta la probabilidad de que se produzcan mutaciones y consecuentemente incrementa el número de anormalidades (429).

Existen algunos síndromes que conducen a envejecimiento acelerado debido a una alta velocidad de acortamiento de los telómeros como son síndrome de Werner (430), Hutchinson-Gilford (431), Bloom (432) y síndrome de Down (433). Igualmente, las alteraciones que se producen en las enzimas reparadoras de modificaciones resultantes de repeticiones alteradas también llevan a síndromes caracterizados por un envejecimiento acelerado como es el caso del síndrome de Cockayne (434), xeroderma pigmentosum y ataxia telangiectasia (435). Todos estos síndromes en los que la aparición de envejecimiento está relacionada con la longitud de los telómeros, apoyan la relación existente entre longitud de los telómeros y longevidad.

TEORÍA GENÉTICA.

Según esta teoría, la longevidad está regulada por cientos de genes que se expresan juntos para formar una red que mantiene el metabolismo y homeostasis de la célula, siendo las alteraciones en dichos genes las que conducen al envejecimiento (436;437). Algunos de estos genes son *age-1*, *Chico*, *clk-1*, *daf-2* (438) y pueden ser clasificados en cuatro categorías: genes anti-estrés, genes relacionados con el metabolismo energético, genes involucrados en la prevención de mutaciones y genes que protegen la homeostasis y señalización celular mediada por hormonas (439).

TERAPIAS ANTIENVEJECIMIENTO

Derivadas del conocimiento cada vez más amplio que poseemos de los mecanismos que dan lugar al envejecimiento, aparecen diversas terapias con el objetivo de incrementar la esperanza de vida o al menos retrasar la aparición de los signos asociados al envejecimiento.

USO DE ANTIOXIDANTES

Teniendo en cuenta la amplia evidencia existente en cuanto a que el daño oxidativo está relacionado con el envejecimiento, el uso de antioxidantes ha sido reiteradamente ensayado con el objetivo de ralentizar este proceso. Su uso en ratones ha probado ser efectivo para incrementar la esperanza de vida (440), pero los datos con los que se cuenta para evaluar su efecto en humanos sólo permiten inferir que son efectivos en la reducción de la incidencia de patologías cardiovasculares, cáncer, diabetes o enfermedad de Alzheimer (441-443).

Actualmente suscitan gran interés los resultados obtenidos con un polifenol derivado de la uva que se denomina resveratrol. Su uso ha demostrado ser efectivo incrementando la esperanza de vida de ratones sometidos a dietas hipercalóricas (444), si bien no tiene efecto en aquellos alimentados una dieta estándar (445). Su mecanismo de acción es distinto al de la mayoría de antioxidantes, ya que se basa en la activación de las sirtuínas. Estas moléculas activan la transcripción de enzimas antioxidantes y favorecen la mitogénesis (446).

La melatonina, uno de los antioxidantes más potentes conocidos, también ha demostrado su efectividad como protector de los ácidos nucleicos y en el retraso de la aparición de los efectos del envejecimiento (447-449)

SUPLEMENTACIÓN HORMONAL

El uso de hormonas para combatir el envejecimiento se fundamenta en la observación de que algunas secreciones endocrinas disminuyen con la edad (450). La suplementación con hormona del crecimiento (GH) y melatonina son los tratamientos más empleados en este campo.

La secreción de GH presenta un patrón pulsátil que decae con la edad y que se correlaciona con cambios en la composición corporal relacionados con el envejecimiento (Sarcopenia, osteopenia...) (451). Su uso mejora la condición física de individuos envejecidos (452), lo que fundamenta su empleo como terapia anti-envejecimiento. Sin embargo está contraindicada en pacientes gravemente enfermos, ya que aumenta su mortalidad (453).

En cuanto a la melatonina, además del efecto antioxidante descrito anteriormente, cabe mencionar que es el principal sincronizador del oscilador circadiano central de nuestro organismo con el ciclo de luz-oscuridad (450). Los picos de secreción registrados al comienzo de la fase oscura van decreciendo con la edad, lo que se acompaña de un progresivo deterioro del oscilador central y de alteraciones en los ritmos de sueño (454). La suplementación con dosis adecuadas de melatonina, administrada de 3 a 6 horas antes de la fase oscura, ha mostrado su efectividad en casos de retraso en la aparición de la fase de sueño (455).

TERAPIAS BASADAS EN LA RESTRICCIÓN CALÓRICA

La restricción calórica (RC) es la maniobra no genética más efectiva para ralentizar el envejecimiento (400). Consiste en reducir en torno a un 30-40% la ingesta diaria, comparado con niveles *Ad libitum*. A pesar de que se conoce desde 1935 el efecto que esta práctica tiene sobre la esperanza de vida (456), no ha sido hasta la década de los 90 del pasado siglo cuando ha empezado a usarse como modelo para el estudio de mecanismos de envejecimiento (457).

El aumento en la esperanza de vida observado con la RC es consecuencia de múltiples efectos a nivel orgánico:

- Cambio metabólico hacia un consumo de ácidos grasos para generar energía. Sus metabolitos entran en la cadena de transporte de electrones por el complejo II, con lo que se evita la generación de multitud de especies reactivas de oxígeno que tiene lugar en el complejo I (458).
- Cambios hormonales caracterizados por una supresión de la producción gonadal y tiroidea de hormonas y del factor de crecimiento similar a GH-insulina 1 (GH-IGF-I), junto con un incremento en los niveles de los picos diarios de corticosterona (459). Además se reducen los niveles de leptina y se incrementan los de ghrelina y adiponectina, un intermediario con propiedades antiinflamatorias, antidiabéticas y antiaterogénicas que parece crucial en los efectos de aumento en la esperanza de vida provocados por la RC (460). Las reducciones en IGF1 y en la señalización para la insulina se postulan como las principales causas de este incremento, ya que ratones con mutaciones que modifican las señales de GH/insulina/IGF viven más que los controles y presentan un fenotipo similar al de los sometidos a RC (461).

La vía intracelular que regula la longevidad de los individuos sometidos a RC parece tener como eje central a la proteína cinasa TOR (Target Of Rapamicin). En las células de mamíferos, TOR forma parte del complejo mTORC1, sensible a la rapamicina y que controla el tamaño celular, la proliferación y la longevidad a través de múltiples cascadas intracelulares.

mTORC1 es un homodímero que tiene 4 componentes además de la serina/treonina cinasa mTOR. Dichos componentes son: Raptor, mLST8, PRAS40 y Deptor. Raptor une mTOR y recluta sus sustratos S6K y 4E-BP de forma que posibilita su fosforilación por el dominio catalítico de mTOR. Otras proteínas que regulan mTOR son las TSC 1 y 2 (Tuberous Sclerosis Complex) que poseen un dominio activado por GTPasas (GAP), y el sustrato preferido de éstas: La GTPasa RHEb. El complejo TSC inhibe la señalización de mTOR a consecuencia de la desactivación de RHEb (462).

mTORC1 integra las respuestas a factores de crecimiento, a los cambios en el estado energético de la célula, los niveles de oxígeno y algunos tipos de estrés. Así, los factores de crecimiento como el IGF o la insulina incrementan la actividad de mTOR1 a consecuencia de fosforilar varios sitios de TSC2, via Akt, disminuyendo su efecto inhibitorio sobre mTOR. El mismo efecto tiene sobre mTORC1 la disminución de la energía disponible en la célula: esto hace que aumente el ratio AMP/ATP activándose AMPcinasa (AMPK), que a su vez estimula a TSC2 e inhibe Raptor, lo que reduce la actividad de mTORC1. Los niveles bajos de oxígeno en la célula desencadenan la transcripción de genes de respuesta a la hipoxia, como REDD1, que inhibe mTORC1 por un mecanismo dependiente de TSC2. Además la hipoxia también reduce los niveles de ATP, controlando mTORC1 a través de AMPK. Por último, la cantidad de aminoácidos también influye sobre el complejo mTORC1, principalmente a través de Rag GTPasas que son sensibles a variaciones en los niveles celulares de aminoácidos. La carencia de aminoácidos provoca inhibición de mTORC1 y por el contrario, altos niveles activan el complejo mediante recolocación de éste en compartimentos ricos en RHEb (462-464).

Además de actuar como sensor en las condiciones descritas, mTORC1 controla el crecimiento celular manteniendo un adecuado equilibrio entre procesos anabólicos y catabólicos. Para ello regula la traducción del material genético a través de sus sustratos S6K y 4E-BP1, controlando específicamente algunos tipos de ARNm involucrados en el crecimiento y diferenciación celular (463). También influye en los procesos de autofagia a través de la cinasa ULK1. La fosforilación de esta cinasa por mTOR impide que se recluten proteínas necesarias para la formación de los autofagosomas, inhibiendo todos los eventos posteriores en la cascada de reacciones de la autofagia (465).

Las sirtuínas son unas deacetilasas proteicas dependientes de NAD⁺ que intervienen en multitud de procesos celulares y que, junto con las acciones de mTOR descritas anteriormente, median los efectos de la RC (466;467). Así, se ha demostrado que la RC carece de efectos en ratones deficientes en estas enzimas (468) y además que ratones que sobreexpresan SIRT1 presentan un fenotipo similar al de los sometidos a RC (469). Las acciones antienvjecimiento de las sirtuínas influyen en procesos como el daño por estrés oxidativo, el daño genético, la biogénesis mitocondrial y la autofagia. Dichas acciones las llevan a cabo mediante deacetilación de sus dianas, entre las que se incluyen: p53, NFkB, PGC-1a, e-NOS, mTOR y FoxOs (470).

El conocimiento de los mecanismos intracelulares relacionados con el envejecimiento y las vías de actuación de la RC han llevado al desarrollo de fármacos que imitan sus efectos. Dichos fármacos actúan a nivel de las principales vías afectadas por la RC: insulina/IGF1,

mTOR y sirtuinas. Algunos ejemplos del desarrollo de estos fármacos son los siguientes: 2-deoxy-D-glucosa y metformina, que actúan sobre la vía de la insulina/IGF1 (471;472); la rapamicina, que inhibe mTOR (473) y el resveratrol que activa SIRT1 a través de AMPK (445).

ENVEJECIMIENTO Y SEÑALIZACIÓN CELULAR.

Independientemente de las causas que lleven al envejecimiento, éste provoca daños en los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos que conducen a alteraciones en el funcionamiento celular. El acúmulo de radicales libres asociado al envejecimiento puede generar oxidaciones y glucosilaciones de las proteínas no mediadas enzimáticamente que conducen a su agregación y a la pérdida de elasticidad de los tejidos, característica muy común de los tejidos envejecidos. Pero la agregación y pérdida de función de las proteínas no es la única alteración que provoca el envejecimiento, sino que también puede inducir isomerizaciones, racemizaciones, y deaminaciones (474;475). El envejecimiento también afecta a la maquinaria encargada de sintetizar las proteínas y puede provocar la síntesis de proteínas no funcionales, además de alterar también los mecanismos celulares que conducen a la degradación de las proteínas. En células envejecidas los cromosomas se encuentran más compactos, lo que indica que hay una menor expresión génica. Esto condiciona que el daño ocasionado por los radicales libres afecte a grandes zonas de los cromosomas, lo que es más perjudicial que mutaciones puntuales. Por otro lado, en el envejecimiento las enzimas reparadoras del ADN se encuentran alteradas, lo que conduce a una mayor acumulación del daño. Así, modificaciones en las proteínas y en los ácidos nucleicos provocan alteraciones de las vías de señalización celular, aunque existen multitud de diferencias entre tejidos y especies. Respecto a los receptores, los que poseen actividad tirosina cinasa son más susceptibles al envejecimiento que los acoplados a proteínas G, que o no cambian o incluso incrementan su participación para compensar el daño sobre los primeros (476). Asociados al envejecimiento en varios tipos celulares, incluido el músculo liso, se han descrito cambios cuantitativos y cualitativos de los receptores para los factores de crecimiento incluyendo una menor expresión y una menor activación (476). Además de alterar los receptores con actividad tirosina cinasa, el envejecimiento también puede afectar a los miembros de las vías intracelulares localizados tras los receptores como Ras, PLC, PLD y PKC cuya activación disminuye con la edad, estando también alterada la translocación de los factores de transcripción (476;477). Respecto a los receptores acoplados a proteínas G, los efectos no están tan claros. En el corazón se ha descrito una disminución de la densidad de receptores α -adrenergicos (478) y una menor cantidad de la enzima adenilato ciclasa (479). La activación de receptores acoplados a proteínas G puede conducir a la formación de IP3 a través de la PLC, pero el efecto del envejecimiento sobre dicha formación varía mucho según los tejidos (480).

EL ENVEJECIMIENTO DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.

Al igual que ocurre con otros sistemas orgánicos, la incidencia de alteraciones del tracto gastrointestinal se incrementa en personas mayores de 65 años. Dichas alteraciones conducen a disfagia, reflujo gastro-esofágico, dispepsia, desordenes en la función colónica, sobrecrecimiento bacteriano, estreñimiento e incontinencia fecal (481) y son debidas a que el envejecimiento afecta a la absorción, secreción y motilidad del tracto gastrointestinal. Existen áreas con mayor riesgo de desarrollar alteraciones en el envejecimiento como son el tracto gastrointestinal superior (particularmente la orofaringe y el esófago) y las regiones distales como el colon (482).

En el caso del esófago se ha descrito que en ancianos las contracciones esofágicas presentan una menor velocidad y duración, provocando una disminución en el tránsito y disfagia (483;484). Aunque parece que el envejecimiento no provoca cambios en la función del estómago, en ocasiones se ha descrito un retraso en el vaciamiento gástrico en ancianos (485) y una mayor sensibilidad al daño por antiinflamatorios no esteroideos (486). Las alteraciones provocadas por el envejecimiento sobre al intestino delgado incluyen la disminución del peristaltismo postprandial, la reducción en la frecuencia de migración del complejo motor y de la propagación de contracciones agrupadas (487). Dichas alteraciones llevan asociadas un menor tránsito a nivel del colon y consecuentemente estreñimiento, el cual puede estar también asociado a una mayor pasividad del anciano y mejora mediante una dieta rica en fibra y agua (488;489). El envejecimiento de la región ano-rectal se caracteriza por una menor distensibilidad, pérdida de sensibilidad rectal y menor presión basal del esfínter anal interno, que conducen a incontinencia fecal (490-492). Todos estos trastornos asociados al envejecimiento son debidos a alteraciones en el sistema nervioso entérico y en el propio músculo liso.

EFFECTOS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO.

En multitud de estudios realizados en humanos y en animales de laboratorio se ha descrito una reducción en el número de neuronas del sistema nervioso entérico (493). La velocidad de deterioro suele ser lineal y el resultado final oscila entre un 20 y 60 % de reducción, dependiendo de la especie y de la región analizada. Así en humanos el esófago sufre un 30 % (494), el colón un 40 % (495) y el intestino delgado un 40 % de reducción (496), mientras que la inervación del estómago permanece prácticamente inalterada (497). En cuanto a las subpoblaciones neuronales más vulnerables, se ha descrito que el plexo submucoso sufre una menor denervación (15-20 % de reducción) que el plexo mientérico (40 % de reducción) (498). Además, se conoce que la inervación colinérgica es más susceptible que la inervación nitrérgica, que permanece inalterada o poco afectada por el envejecimiento (482;499-503). En los nervios colinérgicos, se ha descrito que la síntesis de acetilcolina permanece invariable, sin embargo la liberación del neurotransmisor es menor, debido a una reducción en la actividad del canal de calcio de tipo N presente en las terminaciones nerviosas. De hecho con el uso de ionóforos para el calcio, la liberación de acetilcolina se restaura hasta niveles similares a jóvenes (504). Además de una menor liberación de acetilcolina, se ha descrito un incremento en la actividad

acetilcolinesterasa asociada al envejecimiento que se traduce en una menor participación de las fibras colinérgicas en la respuesta contráctil del tracto gastrointestinal (505).

Parece que el incremento en las especies reactivas de oxígeno es la principal causa de pérdida neuronal asociada al envejecimiento (506). De hecho se ha demostrado que las dietas hipocalóricas reducen la producción de especies reactivas de oxígeno en las neuronas entéricas, y consecuentemente, pueden provocar una recuperación de dicho plexo (507). Además, asociado al envejecimiento se ha descrito que, tanto la generación de ciertas sustancias en el sistema inmune gastrointestinal como la reducción de los factores neurotróficos secretados por las células de Schwann y de los sistemas neuroprotectores, están implicadas en la aparición de algunas patologías neurales del tracto gastrointestinal (508).

EFFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE EL MÚSCULO LISO DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.

Aunque en la mayoría del músculo liso que forma parte del tracto gastrointestinal el envejecimiento provoca una pérdida de la contractilidad que se traduce en una menor peristalsis, el músculo más estudiado a nivel celular es el colon. En el esófago se ha descrito un engrosamiento de la capa muscular y fibrosis que conducen a una menor cinética esofágica (509). En el año 2003 Bitar describió que las células procedentes del colon de ratas envejecidas presentaban una menor longitud, lo que podría ser un impedimento estérico para el deslizamiento de los filamentos contráctiles, presentando así una menor velocidad de acortamiento y una menor respuesta contráctil (510). Otro efecto del envejecimiento que provoca pérdida de la contractilidad del músculo liso es la reducción en la señal de calcio, tanto a nivel de entrada de calcio desde el medio extracelular como de la liberación desde depósito intracelulares de calcio (511-514). Además, la reducción en la respuesta contráctil del colon de ratas asociado al envejecimiento, parece deberse a una menor expresión y activación de algunas isoformas de la PKC, de la vía Src-MAPK, de la maquinaria contráctil y de las proteínas reguladoras de la contracción como es la HSP-27 (515). Al igual que en el colon, el envejecimiento provoca una reducción de las vías intracelulares que conducen a contracción del recto y conducen a incontinencia fecal (516).

ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL ENVEJECIMIENTO.

Las alteraciones o daños sobre los órganos, tejidos, células o moléculas inducidas por el envejecimiento conducen generalmente al desarrollo de patologías. Enfermedades como artritis, osteoporosis, cardiopatías, cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, incontinencia urinaria... son todas ellas enfermedades asociadas al envejecimiento, ya que su incidencia incrementa con la edad (517).

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta como deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Suele aparecer a partir de los 50 años y afecta a unos 15 millones de personas en el mundo, siendo la mayor causa de pérdida de capacidad cognitiva en la población envejecida (518). Está ampliamente aceptado que el acúmulo de especies reactivas asociado al envejecimiento provoca las principales alteraciones neuro-morfo-fisiológicas presentes en esta enfermedad como son: formación de placas α -amiloides, acúmulo de neurofilamentos y pérdida neuronal sobre todo a nivel del hipocampo y córtex cerebral (519-522). En esta misma línea, el tratamiento con agentes antioxidantes en pacientes y en estudios in vitro ha conseguido ralentizar el avance de la enfermedad (523).

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por un deterioro progresivo de las neuronas dopaminérgicas presentes en la sustancia negra del tallo cerebral. La pérdida de estas neuronas se debe a una auto-oxidación de la dopamina debido a la exposición a altas concentraciones de radicales libres, condición estrechamente relacionada con el envejecimiento (524). Su sintomatología gira en torno a la pérdida de coordinación de movimientos, derivando hacia una reducción de la movilidad e incluso parálisis cuando la enfermedad llega a sus fases más avanzadas. Sin embargo, se conoce también que esta enfermedad cursa en sus primeras etapas con alteraciones gastrointestinales (525), lo que puede constituir una herramienta útil de diagnóstico temprano, a la vez que abre un nuevo campo para la investigación del desarrollo de esta enfermedad.

La acumulación de daños en el sistema cardiovascular debido al envejecimiento provoca un incremento en la probabilidad de sufrir un infarto o fallo cardíaco. Si bien, los efectos del envejecimiento sobre el sistema cardiovascular dependen del tejido considerado, ya que el envejecimiento provoca un incremento de la contractilidad del tejido aórtico incrementando la rigidez del vaso, lo que puede conducir a incrementos en la presión sistólica, mientras que la contracción de la vena cava, podría provocar cambios en la precarga cardíaca y en la presión diastólica (526). A nivel del corazón el envejecimiento provoca un incremento en el peso del órgano debido a un aumento del tamaño de los cardiomiocitos acompañado de una mayor deposición de colágeno (527). Además, otro cambio descrito en el corazón envejecido es una degeneración parcial de los nervios simpáticos (527). Funcionalmente, el corazón envejecido sufre un menor llenado temprano y un incremento en el llenado tardío, lo que hace que los individuos envejecidos sean más propensos a desarrollar un fallo cardíaco diastólico (528). A

nivel de las grandes arterias, el envejecimiento produce un engrosamiento de la capa íntima y media vascular debido a hiperplasia y acúmulo de filamentos que forman la matriz extracelular, aumentando el riesgo de desarrollo de arteriosclerosis e hipertensión (529). La hiperplasia vascular asociada al envejecimiento puede ser debida a un incremento en la capacidad proliferativa celular o a una reducción en la incidencia de apoptosis (530). El engrosamiento de la pared vascular provoca la acumulación de sustancias relacionadas con procesos inflamatorios y/o de formación de ateromas, así como una menor distensibilidad que puede incrementar la presión sistólica (531). Dicha hiperplasia lleva asociada un cambio fenotípico de las células en el que varían las proteínas que forman parte del citoesqueleto y de la maquinaria contráctil (532). Así mismo, el cambio fenotípico va asociado a alteraciones en la señalización celular como son: una mayor expresión de iNOS, una reducción de eNOS, un incremento en receptores α -adrenérgicos acompañado de una disminución de receptores α y una menor capacidad de respuesta ante agentes pro-inflamatorios (533). Estos cambios en el sistema cardiovascular asociados al envejecimiento aumentan el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. También se ha descrito que en el envejecimiento existe un aumento de las enfermedades neoplásicas y una depresión del sistema inmune (534).

LA MELATONINA.

La melatonina (N-acetil-metoxitriptamina) es una neuro-hormona que ha sido estudiada en profundidad para determinar sus funciones exactas y su posible uso como agente farmacológico. El interés puesto en esta hormona radica en que se ha demostrado que en determinadas situaciones, la melatonina es capaz de paliar los daños inducidos por las especies reactivas de oxígeno sobre los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. A partir de estas observaciones se ha sugerido que la melatonina sería eficaz para combatir los síndromes asociados a la acumulación de radicales libres, lo que ha dado pie a al estudio de su posible papel terapéutico en multitud de situaciones fisiopatológicas.

MELATONINA: SÍNTESIS Y SECRECIÓN.

La melatonina se produce a partir del aminoácido triptófano, el cual sufre una hidroxilación y posteriormente una descarboxilación, formándose respectivamente 5-hidroxitriptófano y serotonina. Las enzimas encargadas de estos primeros pasos tienen una distribución muy ubicua. Sin embargo, la transformación de serotonina en melatonina está restringida a ciertos órganos en los que se localizan las enzimas N-acetiltransferasa e hidroxindol-O-metiltransferasa. Dichas enzimas, actuando de forma secuencial, conducen a la conversión de serotonina en melatonina (535-537). La principal fuente de melatonina es la glándula pineal, pero se ha descrito que otros tejidos pueden sintetizar y secretar melatonina. Entre ellos se incluyen la retina, las glándulas lacrimales, el intestino, el epitelio de los bronquios, el páncreas, las glándulas suprarrenales, el tiroides, el timo, el tracto urogenital y la placenta (535). Es de especial relevancia la producción de melatonina en las células enterocromafines del intestino, habiéndose estimado que la cantidad de melatonina normalizada por gramo de tejido es 400 veces superior a la existente en la glándula pineal (538;539).

En la mayoría de individuos y animales jóvenes, la producción de melatonina por la glándula pineal sigue un ritmo circadiano con máximos de producción y secreción por la noche, que van disminuyendo durante el día. La presencia de este potente ritmo circadiano regulado por la luz, está controlada por un tracto óptico-pineal que va desde la retina hasta la glándula pineal pasando por el núcleo supraquiasmático. Así, durante la fase oscura, el núcleo supraquiasmático estimula al ganglio cervical superior y a la glándula pineal provocando la secreción de melatonina (540). Cuando la luz llega a la retina, el núcleo supraquiasmático deja de excitar la glándula pineal y frena la producción y secreción de melatonina. Los pinealocitos, células endocrinas de la glándula pineal, secretan melatonina al torrente sanguíneo nada más ser sintetizada, de tal forma que el incremento nocturno de la síntesis y secreción de melatonina, se refleja rápidamente en los niveles sanguíneos de dicha hormona. Un hecho importante es que la presencia de este ritmo circadiano de producción y secreción de melatonina de la glándula pineal está limitada a individuos jóvenes y adultos, ya que el envejecimiento produce una disminución notable de la síntesis de melatonina (541). Esta reducción se debe a una menor expresión de los receptores α y β -adrenérgicos de la membrana del pinealocito (542) y a una pérdida de las

neuronas glutamatérgicas, las cuales regulan la síntesis de melatonina y son muy sensibles al envejecimiento (543).

RECEPTORES PARA LA MELATONINA.

En humanos y en animales superiores se han descrito tres tipos de receptores para la melatonina, que pueden localizarse en la membrana plasmática (MT1 y MT2) o a nivel citoplasmático (MT3 también denominado QR2). Los dos primeros se caracterizan por ser receptores acoplados a proteínas G que conducen a la formación de inosítoles fosfato e inhiben la adenilato y guanilato ciclasa, mientras que los receptores citoplasmáticos parecen estar involucrados en procesos antioxidantes. Los receptores para la melatonina pueden localizarse a nivel neural (núcleo supraquiasmático o en la capa flexiforme interna de la retina) y a nivel no neuronal como en la pars tuberalis de la hipófisis y en arterias caudales y cerebrales (544;545).

ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA MELATONINA.

La melatonina, gracias a su secreción en forma circadiana, informa al sistema endocrino sobre las condiciones ambientales, especialmente sobre el fotoperíodo. En este aspecto las principales funciones de la melatonina son: la regulación de los ritmos de otras hormonas, de los ciclos sueño-vigilia, de la época reproductiva y de la temperatura corporal (546).

Además, entre las acciones de la melatonina se encuentra una potente capacidad antioxidante, desarrollando un papel defensivo contra el estrés oxidativo. Esto la convierte en una herramienta farmacológica cuyos efectos beneficiosos han sido ampliamente recogidos en la bibliografía.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MELATONINA.

La capacidad antioxidante de la melatonina se basa en sus propiedades como neutralizador de radicales libres y en su habilidad para activar otros mecanismos antioxidantes. La melatonina es altamente difusible y por tanto es capaz de ejercer sus efectos directos como antioxidante en la membrana citoplasmática, en el citoplasma y en el núcleo. Las características estructurales que le permiten actuar como un potente secuestrador de radicales libres son: el grupo metilo localizado en posición 5 del indol y el grupo acetilo, de tal forma que sin estos grupos su capacidad para neutralizar radicales libres merma e incluso se puede convertir en un compuesto pro-oxidante (547). Pero además, la melatonina puede promover la activación de las defensas antioxidantes endógenas por su efecto estimulador sobre la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa (548). Adicionalmente, también se ha descrito que los metabolitos de la melatonina tienen capacidad antioxidante, especialmente su primer derivado: la *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxikynuramina (más conocido como AFMK). Esta propiedad conjunta de la melatonina y sus metabolitos han dado origen al término de la "cascada

antioxidante de la melatonina” y hace de este compuesto uno de los más efectivos como neutralizador de especies reactivas de oxígeno, incluso a bajas concentraciones (549).

POSIBLES INDICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA MELATONINA.

Es indudable que las propiedades antioxidantes de la melatonina la convierten en una herramienta farmacológica muy efectiva para tratar los efectos devastadores provocados por el envejecimiento, en el que la acumulación de radicales libre juega un papel fundamental. El uso de la melatonina para tratar los desórdenes del sueño resultó muy satisfactorio en multitud de casos (550;551). Además, su uso está muy indicado frente a desórdenes circadianos provocados por la ceguera, cambios de turnos de trabajo y vuelos transcontinentales en los que se cruzan varias zonas horarias (552-554). Adicionalmente, a la melatonina se le han atribuido propiedades oncostáticas (555), cardioprotectoras (556), contraceptivas (557;558) e inmunomoduladoras (535).

INDICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA MELATONINA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL.

El tracto gastrointestinal es la principal fuente extrapineal de melatonina, encontrándose en una concentración de hasta 400 veces mayor que en la glándula pineal (559). En la bilis se detectan niveles de melatonina 10-40 veces superior al resto del tracto gastrointestinal (560), como consecuencia de ser el hígado el encargado de metabolizar la melatonina (535) y ser la bilis su principal vía de excreción (561). Sin embargo aún no se ha descrito la función de dicha neuro-hormona en el tracto gastrointestinal. La producción y secreción de la melatonina por parte del tracto gastrointestinal está totalmente regulada por la ingesta (562). La gran abundancia de melatonina indica que podría ser un regulador local de la función gastrointestinal (563), de hecho en ratones la melatonina regula el tránsito intestinal (564). En cobayas se ha descrito que los efectos de la melatonina sobre la motilidad digestiva se producen a través del bloqueo de los canales activados por acetilcolina localizados a nivel postsináptico (565). Pero los efectos pro o anticinéticos de la melatonina sobre el tracto gastrointestinal dependen de la dosis y de la duración del tratamiento, así tratamientos crónicos y a bajas dosis tienen efectos estimulatorios (566;567).

La melatonina puede considerarse como un posible agente protector en varias patologías del tracto gastrointestinal. Estudios preliminares indicaban que la melatonina tenía efectos protectores y reparadores frente a la formación de úlceras gástricas (568). Estudios más recientes han propuesto que la prevención de las lesiones gástricas por parte de la melatonina se debe probablemente a su efecto antiserotoninérgico, que bloquea la reducción del flujo sanguíneo inducida por la serotonina, restaurándose así la microcirculación (569). En su acción

gastroprotectora están implicados los receptores para la melatonina de tipo MT₂, la prostaglandina E₂ debido a una sobreexpresión y sobreactivación de COX-2 y la liberación de CGRP desde los nervios sensoriales (570). Además de los efectos beneficiosos sobre la circulación, las propiedades antioxidantes de la melatonina desempeñan un papel importante en la recuperación del estómago (566). Así, la administración intragástrica de melatonina a ratas con úlceras gástricas disminuye significativamente la incidencia de ulceración y el tamaño de las lesiones, ya que la melatonina provoca un descenso del contenido de radicales libres en la pared del estómago y en plasma (571). Los efectos gastroprotectores de la melatonina son comparables a los del omeprazol y la famotidina (572;573) y en este sentido la efectividad de la melatonina supera la de otros antioxidantes clásicos como las vitaminas C o E y la de fármacos como la ranitidina (574;575). Además, la melatonina también protege la mucosa del tracto gastrointestinal estimulando la secreción de bicarbonato desde los enterocitos. Dicha secreción se produce mediante la estimulación de los receptores de la melatonina de tipo MT₂ que provocan un incremento del calcio citoplasmático en el enterocito y la consecuente secreción de bicarbonato (576;577)

En el síndrome de intestino irritable la melatonina podría tener efectos terapéuticos, ya que es efectiva aliviando el dolor abdominal, la distensión abdominal y el tenesmo, a pesar de no mejorar las alteraciones del sueño que presentan este tipo de pacientes (578). De forma similar a lo que ocurre con las úlceras gástricas, en el síndrome de intestino irritable, el tratamiento con melatonina redujo el número de daños en la mucosa intestinal inducidos por un modelo de colitis experimental (579). Además de reducir el daño, la melatonina disminuye la cantidad de NO en el colon y la liberación de prostaglandina E, debido a una menor expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible y de la COX-2 en la mucosa del colon (580-582). Así mismo, se ha descrito que la inflamación inducida por los modelos de colitis experimental se debe a un incremento en la expresión de moléculas proinflamatorias, una excesiva activación del factor de transcripción NF- κ B y una menor participación del factor de transcripción I κ B (583). El tratamiento con melatonina redujo la síntesis de moléculas proinflamatorias y normalizó la participación de los factores de transcripción NF- κ B y I κ B (584).

Mediante el uso de modelos de isquemia-reperfusión para imitar las condiciones patológicas que en ocasiones ocurren en el organismo, se ha puesto de manifiesto otras posibles aplicaciones terapéuticas de la melatonina. Tal es el caso del modelo de isquemia-reperfusión en el íleon, el cual provocó una reducción de la respuesta contráctil de dicho tejido, probablemente debida a una acumulación de especies reactivas de oxígeno y al daño tisular. En este caso el tratamiento con melatonina redujo el daño tisular, la acumulación de radicales libres debido a un incremento en la actividad glutatión reductasa y consecuentemente mejoró la respuesta contráctil del íleon (585-587).

Pese a que la melatonina tiene efectos inmunoestimulantes, no hay evidencias directas de dicho efecto en el tracto gastrointestinal. Si bien, existen evidencias indirectas que indican que la administración de melatonina a ratas incrementa el tamaño de las placas de Peyer, el principal componente del sistema inmune localizado en el tracto gastrointestinal (588;589). Sin embargo, se ha demostrado que el tratamiento con melatonina puede tener efectos perjudiciales debido a la

sobre-estimulación del sistema inmune en patologías como la enfermedad de Crohn y la colitis experimental (588).

MELATONINA, ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA EDAD.

Como se ha descrito anteriormente, el envejecimiento es un fenómeno multifactorial y por ello aún no se ha conseguido llegar a una teoría consensual que explique este proceso. Sin embargo hay algunas teorías que asignan a la glándula pineal y a la melatonina un papel fundamental en el proceso del envejecimiento. Se sabe que los niveles de melatonina disminuyen gradualmente a lo largo de la vida, lo que disminuye la calidad del sueño y altera otros ritmos circadianos. Además, la melatonina posee propiedades inmunomoduladoras, que al perderse conducirían a envejecimiento. Por último, la melatonina es un potente protector contra el estrés oxidativo, con lo que una disminución de su concentración puede contribuir a incrementar la incidencia y severidad de algunas enfermedades relacionadas con la edad.

El envejecimiento de la sociedad actual tiene asociados problemas relacionados con una menor calidad de vida de este segmento poblacional y también profundas repercusiones económicas y sociales. Desde el punto de vista de la salud, el principal problema es el incremento en la incidencia de determinadas enfermedades como son la enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, arteriosclerosis, enfermedades neoplásicas, incontinencia urinaria y/o fecal... Estas patologías merman de forma importante la calidad de vida de las personas e incrementan su grado de dependencia. Existen teorías que relacionan el envejecimiento con la melatonina. Así, se ha descrito que el envejecimiento es debido a que el sistema inmune es menos efectivo, a una desregulación de los ritmos circadianos y a un acumulo de radicales libres. Parece ser que la menor secreción de melatonina es la principal causa que conduce a las alteraciones anteriores y por tanto al envejecimiento (517). Sin embargo, la evidencia experimental más importante que relaciona a la melatonina con el envejecimiento es que la producción y secreción de la melatonina disminuye con la edad. Dicha pérdida tiene una serie de consecuencias entre las que destacan las alteraciones de los ritmos circadianos que conducen a cronopatologías como alteraciones del sueño y consecuentemente, al deterioro de la salud (590). El papel regulador del sistema inmune por parte de la melatonina disminuye con la edad, provocando una reducción en el número de las células inmunes, una menor proliferación de linfocitos, diferentes niveles de expresión de citocinas y la alteración del índice de fagocitosis (591), de modo que la administración exógena de melatonina provoca un restablecimiento del sistema inmune. Pero quizás, las propiedades antioxidantes de la melatonina o más bien su ausencia, sean la principal causa que conduzca al acúmulo de radicales libres asociado al envejecimiento (592).

El daño oxidativo desempeña un papel importante en la patogénesis de algunas enfermedades neurodegenerativas características de la población envejecida, habiéndose descrito que la melatonina tiene efectos terapéuticos en pacientes con enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson y que en ciertas neoplasias la melatonina redujo la velocidad de

división celular, aunque parece ser que dichos efectos son mediados a través del sistema inmune (593).

En conclusión, la menor producción de melatonina en ancianos juega un papel muy importante en las enfermedades relacionadas con la edad. Esto sugiere que la pérdida de este agente antioxidante, regulador de ritmos circadianos e inmunomodulador, puede tener relación con el incremento de la incidencia y la severidad de ciertas patologías. En esta línea, parte de los experimentos desarrollados en esta tesis doctoral han ido encaminados a determinar el efecto de la suplementación crónica con melatonina sobre el envejecimiento en el colon y páncreas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Stromer MH. Immunocytochemistry of the Muscle-Cell Cytoskeleton. *Microsc Res Tech* 1995 Jun 1;31(2):95-105.
- (2) Somlyo AP. Myosin Isoforms in Smooth-Muscle - How May They Affect Function and Structure. *J Smooth Muscle Res* 1993 Dec;14(6):557-63.
- (3) Strzeleckagolaszewska H, Hinssen H, Sobieszek A. Influence of An Actin-Modulating Protein from Smooth-Muscle on Actin Myosin Interaction. *FEBS Lett* 1984;177(2):209-16.
- (4) Sobieszek A, Bremel RD. Preparation and Properties of Vertebrate Smooth-Muscle Myofibrils and Actomyosin. *Eur J Biochem* 1975;55(1):49-60.
- (5) Bond M, Somlyo AV. Dense Bodies and Actin Polarity in Vertebrate Smooth-Muscle. *J Cell Biol* 1982;95(2):403-13.
- (6) Sellers JR, Adelstein RS. Cooperativity and the Reversible Phosphorylation of Smooth-Muscle Heavy-Meromyosin. *Biophys J* 1982;37(2):A262.
- (7) Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 1996 Oct;76(4):967-1003.
- (8) Ikebe M, Hartshorne DJ, Elzinga M. Phosphorylation of the 20,000-Dalton Light Chain of Smooth-Muscle Myosin by the Calcium-Activated, Phospholipid-Dependent Protein-Kinase - Phosphorylation Sites and Effects of Phosphorylation. *J Biol Chem* 1987 Jul 15;262(20):9569-73.
- (9) Meldolesi J, Madeddu L, Pozzan T. Intracellular Ca²⁺ storage organelles in non-muscle cells: heterogeneity and functional assignment. *Biochim Biophys Acta* 1990 Nov 12;1055(2):130-40.
- (10) Allbritton NL, Meyer T, Stryer L. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science* 1992 Dec 11;258(5089):1812-5.
- (11) Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 1994 Jul;74(3):595-636.
- (12) Sorrentino V, Rizzuto R. Molecular genetics of Ca(2+) stores and intracellular Ca(2+) signalling. *Trends Pharmacol Sci* 2001 Sep;22(9):459-64.
- (13) Rizzuto R, Brini M, Pozzan T. Intracellular targeting of the photoprotein aequorin: a new approach for measuring, in living cells, Ca²⁺ concentrations in defined cellular compartments. *Cytotechnology* 1993;11 Suppl 1:S44-S46.

- (14) Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, et al. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2000 Feb;2(2):57-61.
- (15) Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E, et al. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci* 2004 Aug 15;117(Pt 18):4135-42.
- (16) Oakes SA, Scorrano L, Opferman JT, Bassik MC, Nishino M, Pozzan T, et al. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Jan 4;102(1):105-10.
- (17) Berridge MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol* 1997 Jan;200(Pt 2):315-9.
- (18) John LM, Lechleiter JD, Camacho P. Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J Cell Biol* 1998 Aug 24;142(4):963-73.
- (19) Roderick HL, Lechleiter JD, Camacho P. Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca²⁺ oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol* 2000 Jun 12;149(6):1235-48.
- (20) Montero M, Brini M, Marsault R, Alvarez J, Sitia R, Pozzan T, et al. Monitoring dynamic changes in free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *EMBO J* 1995 Nov 15;14(22):5467-75.
- (21) Bygrave FL, Benedetti A. What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum? *Cell Calcium* 1996 Jun;19(6):547-51.
- (22) Pinton P, Ferrari D, Magalhaes P, Schulze-Osthoff K, Di VF, Pozzan T, et al. Reduced loading of intracellular Ca²⁺ stores and downregulation of capacitative Ca²⁺ influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol* 2000 Mar 6;148(5):857-62.
- (23) Alvarez J, Montero M. Measuring [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell Calcium* 2002 Nov;32(5-6):251-60.
- (24) Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA, Pozzan T, Korsmeyer SJ. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J* 2004 Mar 10;23(5):1207-16.
- (25) Palmer AE, Jin C, Reed JC, Tsien RY. Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Dec 14;101(50):17404-9.
- (26) Verkhratsky A. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev* 2005 Jan;85(1):201-79.
- (27) Lodish HF, Kong N. Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1990 Jul 5;265(19):10893-9.

- (28) Lodish HF, Kong N, Wikstrom L. Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1992 Jun 25;267(18):12753-60.
- (29) Kuznetsov G, Brostrom MA, Brostrom CO. Role of endoplasmic reticular calcium in oligosaccharide processing of alpha 1-antitrypsin. *J Biol Chem* 1993 Jan 25;268(3):2001-8.
- (30) MacKrell JJ. Protein-protein interactions in intracellular Ca²⁺-release channel function. *Biochem J* 1999 Feb 1;337 (Pt 3):345-61.
- (31) Putney JW, Jr., Broad LM, Braun FJ, Lievremont JP, Bird GS. Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* 2001 Jun;114(Pt 12):2223-9.
- (32) Berridge MJ. Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays* 1995 Jun;17(6):491-500.
- (33) McCarron JG, Muir TC. Mitochondrial regulation of the cytosolic Ca²⁺ concentration and the InsP₃-sensitive Ca²⁺ store in guinea-pig colonic smooth muscle. *J Physiol* 1999 Apr 1;516 (Pt 1):149-61.
- (34) Sanders KM. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol* 2001 Sep;91(3):1438-49.
- (35) Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 2004 Jan 22;427(6972):360-4.
- (36) Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999 Oct;79(4):1127-55.
- (37) Pacher P, Thomas AP, Hajnoczky G. Ca²⁺ marks: miniature calcium signals in single mitochondria driven by ryanodine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Feb 19;99(4):2380-5.
- (38) Missiaen L, Van AK, Van BK, Raeymaekers L, Wuytack F, Parys JB, et al. Calcium release from the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum in HeLa cells stably expressing targeted aequorin to these compartments. *Cell Calcium* 2004 Dec;36(6):479-87.
- (39) Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L. PMR1/SPCA Ca²⁺ pumps and the role of the Golgi apparatus as a Ca²⁺ store. *Pflugers Arch* 2003 May;446(2):148-53.
- (40) Burgoyne RD, Clague MJ. Calcium and calmodulin in membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* 2003 Aug 18;1641(2-3):137-43.
- (41) Chandra S, Kable EP, Morrison GH, Webb WW. Calcium sequestration in the Golgi apparatus of cultured mammalian cells revealed by laser scanning confocal microscopy and ion microscopy. *J Cell Sci* 1991 Dec;100 (Pt 4):747-52.
- (42) Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 1998 Sep 15;17(18):5298-308.

- (43) Van Baelen K, Vanoevelen J, Callewaert G, Parys JB, De Smedt H, Raeymaekers L, et al. The contribution of the SPCA1 Ca²⁺ pump to the Ca²⁺ accumulation in the Golgi apparatus of HeLa cells assessed via RNA-mediated interference. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Jun 27;306(2):430-6.
- (44) Lin P, Yao Y, Hofmeister R, Tsien RY, Farquhar MG. Overexpression of CALNUC (nucleobindin) increases agonist and thapsigargin releasable Ca²⁺ storage in the Golgi. *J Cell Biol* 1999 Apr 19;145(2):279-89.
- (45) Rojas P, Surroca A, Orellana A, Wolff D. Kinetic characterization of calcium uptake by the rat liver Golgi apparatus. *Cell Biol Int* 2000;24(4):229-33.
- (46) Shull GE. Gene knockout studies of Ca²⁺-transporting ATPases. *Eur J Biochem* 2000 Sep;267(17):5284-90.
- (47) Behne MJ, Tu CL, Aronchik I, Epstein E, Bench G, Bikle DD, et al. Human keratinocyte ATP2C1 localizes to the Golgi and controls Golgi Ca²⁺ stores. *J Invest Dermatol* 2003 Oct;121(4):688-94.
- (48) Kawano J, Kotani T, Ogata Y, Ohtaki S, Takechi S, Nakayama T, et al. CALNUC (nucleobindin) is localized in the Golgi apparatus in insect cells. *Eur J Cell Biol* 2000 Mar;79(3):208-17.
- (49) Scherer PE, Lederkremer GZ, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. Cab45, a novel (Ca²⁺)-binding protein localized to the Golgi lumen. *J Cell Biol* 1996 Apr;133(2):257-68.
- (50) Morel-Huaux VM, Pypaert M, Wouters S, Tartakoff AM, Jurgan U, Gevaert K, et al. The calcium-binding protein p54/NEFA is a novel luminal resident of medial Golgi cisternae that traffics independently of mannosidase II. *Eur J Cell Biol* 2002 Feb;81(2):87-100.
- (51) Vanoevelen J, Raeymaekers L, Parys JB, De SH, Van BK, Callewaert G, et al. Inositol trisphosphate producing agonists do not mobilize the thapsigargin-insensitive part of the endoplasmic-reticulum and Golgi Ca²⁺ store. *Cell Calcium* 2004 Feb;35(2):115-21.
- (52) Jahn R, Lang T, Sudhof TC. Membrane fusion. *Cell* 2003 Feb 21;112(4):519-33.
- (53) Nguyen T, Chin WC, Verdugo P. Role of Ca²⁺/K⁺ ion exchange in intracellular storage and release of Ca²⁺. *Nature* 1998 Oct 29;395(6705):908-12.
- (54) Quesada I, Chin WC, Steed J, Campos-Bedolla P, Verdugo P. Mouse mast cell secretory granules can function as intracellular ionic oscillators. *Biophys J* 2001 May;80(5):2133-9.
- (55) Quesada I, Chin WC, Verdugo P. ATP-independent luminal oscillations and release of Ca²⁺ and H⁺ from mast cell secretory granules: implications for signal transduction. *Biophys J* 2003 Aug;85(2):963-70.

- (56) De Koninck P, Schulman H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* 1998 Jan 9;279(5348):227-30.
- (57) Oancea E, Meyer T. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* 1998 Oct 30;95(3):307-18.
- (58) Muallem S, Lee MG. High [Ca²⁺]_i domains, secretory granules and exocytosis. *Cell Calcium* 1997 Jul;22(1):1-4.
- (59) Barclay JW, Morgan A, Burgoyne RD. Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium* 2005 Sep;38(3-4):343-53.
- (60) Berridge MJ. Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature* 1993 Sep 30;365(6445):388-9.
- (61) Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 1995 Jan 27;80(2):259-68.
- (62) Ji Y, Loukianov E, Loukianova T, Jones LR, Periasamy M. SERCA1a can functionally substitute for SERCA2a in the heart. *Am J Physiol* 1999 Jan;276(1 Pt 2):H89-H97.
- (63) East JM. Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps: recent advances in our understanding of structure/function and biology (review). *Mol Membr Biol* 2000 Oct;17(4):189-200.
- (64) Toyoshima C, Nomura H. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 2002 Aug 8;418(6898):605-11.
- (65) Vangheluwe P, Raeymaekers L, Dode L, Wuytack F. Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. *Cell Calcium* 2005 Sep;38(3-4):291-302.
- (66) Becker PL, Singer JJ, Walsh JV, Fay FS. Regulation of Calcium-Concentration in Voltage-Clamped Smooth-Muscle Cells. *Science* 1989 Apr 14;244(4901):211-4.
- (67) Carafoli E. The homeostasis of calcium in heart cells. *J Mol Cell Cardiol* 1985 Mar;17(3):203-12.
- (68) Zhang BX, Muallem S. Feedback Inhibition of Ca²⁺ Release by Ca²⁺ Is the Underlying Mechanism of Agonist-Evoked Intracellular Ca²⁺ Oscillations in Pancreatic Acinar-Cells. *J Biol Chem* 1992 Dec 5;267(34):24387-93.
- (69) Furukawa K, Tawadaiwata Y, Shigekawa M. Modulation of Plasma-Membrane Ca²⁺ Pump by Membrane-Potential in Cultured Vascular Smooth-Muscle Cells. *J Biol Chem* 1989 Dec;106(6):1068-73.
- (70) Liu L, Ishida Y, Okunade G, Shull GE, Paul RJ. Role of plasma membrane Ca²⁺-ATPase in contraction-relaxation processes of the bladder: evidence from PMCA gene-ablated mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 Apr;290(4):C1239-C1247.

(71) Wu C, Fry CH. Na(+)/Ca(2+) exchange and its role in intracellular Ca(2+) regulation in guinea pig detrusor smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 May;280(5):C1090-C1096.

(72) Ganitkevich VY. Clearance of large Ca²⁺ loads in a single smooth muscle cell: examination of the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake and intracellular pH. *Cell Calcium* 1999 Jan;25(1):29-42.

(73) Low AM, Kwan CY, Daniel EE. Evidence for two types of internal Ca²⁺ stores in canine mesenteric artery with different refilling mechanisms. *Am J Physiol* 1992 Jan;262(1 Pt 2):H31-H37.

(74) Greenwood IA, Helliwell RM, Large WA. Effect of inhibitors of mitochondrial and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake on the time course of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in smooth muscle cells. *Biophys J* 1997 Feb;72(2):WP119.

(75) Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 Nov;291(5):C1082-C1088.

(76) Nicholls DG. Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium* 2005 Sep;38(3-4):311-7.

(77) Giannattasio B, Jones SW, Scarpa A. Calcium Currents in the A7R5 Smooth-Muscle Derived Cell-Line - Calcium-Dependent and Voltage-Dependent Inactivation. *J Gen Physiol* 1991 Nov;98(5):987-1003.

(78) Tsien RW, Hess P, McCleskey EW, Rosenberg RL. Calcium Channels - Mechanisms of Selectivity, Permeation, and Block. *Annu Rev Biophys Chem* 1987;16:265-90.

(79) Bean BP. Multiple types of calcium channels in heart muscle and neurons. Modulation by drugs and neurotransmitters. *Ann N Y Acad Sci* 1989;560:334-45.

(80) Glossmann H, Striessnig J. Molecular properties of calcium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990;114:1-105.

(81) Triggle DJ. The physiological and pharmacological significance of cardiovascular T-type, voltage-gated calcium channels. *Am J Hypertens* 1998 Apr;11(4 Pt 3):80S-7S.

(82) Beech DJ. Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca²⁺ channels and K⁺ channels in smooth muscle cells. *Pharmacol Ther* 1997;73(2):91-119.

(83) Somlyo AV, Somlyo AP. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1968 Jan;159(1):129-45.

(84) Benham CD, Bolton TB. Patch-clamp studies of slow potential-sensitive potassium channels in longitudinal smooth muscle cells of rabbit jejunum. *J Physiol* 1983 Jul;340:469-86.

- (85) Bolton TB, Zholos AV. Activation of M2 muscarinic receptors in guinea-pig ileum opens cationic channels modulated by M3 muscarinic receptors. *Life Sci* 1997;60(13-14):1121-8.
- (86) Inoue R, Kitamura K, Kuriyama H. Acetylcholine activates single sodium channels in smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 1987 Sep;410(1-2):69-74.
- (87) Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 1994 Oct 6;371(6497):519-23.
- (88) Nori S, Fumagalli L, Bo X, Bogdanov Y, Burnstock G. Coexpression of mRNAs for P2X1, P2X2 and P2X4 receptors in rat vascular smooth muscle: an in situ hybridization and RT-PCR study. *J Vasc Res* 1998 May;35(3):179-85.
- (89) McFadzean I, Gibson A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2002 Jan;135(1):1-13.
- (90) Pacaud P, Bolton TB. Relation between muscarinic receptor cationic current and internal calcium in guinea-pig jejunal smooth muscle cells. *J Physiol* 1991 Sep;441:477-99.
- (91) Kim HY, Thomas D, Hanley MR. Chromatographic resolution of an intracellular calcium influx factor from thapsigargin-activated Jurkat cells. Evidence for multiple activities influencing calcium elevation in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1995 Apr 28;270(17):9706-8.
- (92) Kim HY, Hanley MR. Calcium influx factor (CIF) as a diffusible messenger for the activation of capacitative calcium entry in *Xenopus* oocytes. *Mol Cells* 1999 Jun 30;9(3):326-32.
- (93) Albert AP, Aromolaran AS, Large WA. Agents that increase tyrosine phosphorylation activate a non-selective cation current in single rabbit portal vein smooth muscle cells. *J Physiol* 2001 Jan 15;530(Pt 2):207-17.
- (94) Oike M, Kitamura K, Kuriyama H. Protein kinase C activates the non-selective cation channel in the rabbit portal vein. *Pflugers Arch* 1993 Jul;424(2):159-64.
- (95) Ahn SC, Kim SJ, So I, Kim KW. Inhibitory effect of phorbol 12,13 dibutyrate on carbachol-activated nonselective cationic current in guinea-pig gastric myocytes. *Pflugers Arch* 1997 Aug;434(4):505-7.
- (96) Huang ZM, Thewke D, Gong QQ, Schlichter D, Wicks WD. Functional recognition of the neuronal tyrosine hydroxylase cAMP regulatory element in different cell types. *Brain Res Mol Brain Res* 1991 Oct;11(3-4):309-19.
- (97) Penner R, Fasolato C, Hoth M. Calcium influx and its control by calcium release. *Curr Opin Neurobiol* 1993 Jun;3(3):368-74.
- (98) Luckhoff A, Clapham DE. Calcium channels activated by depletion of internal calcium stores in A431 cells. *Biophys J* 1994 Jul;67(1):177-82.

- (99) DeLisle S, Pittet D, Potter BV, Lew PD, Welsh MJ. InsP₃ and Ins(1,3,4,5)P₄ act in synergy to stimulate influx of extracellular Ca²⁺ in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1992 Jun;262(6 Pt 1):C1456-C1463.
- (100) Trepakova ES, Gericke M, Hirakawa Y, Weisbrod RM, Cohen RA, Bolotina VM. Properties of a native cation channel activated by Ca²⁺ store depletion in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001 Mar 16;276(11):7782-90.
- (101) Irvine RF. Quantal Ca-2+ Release and the Control of Ca-2+ Entry by Inositol Phosphates - A Possible Mechanism. *Febs Letters* 1990 Apr 9;263(1):5-9.
- (102) Pandol SJ, Schoeffieldpayne MS. Cyclic-Gmp Mediates the Agonist-Stimulated Increase in Plasma-Membrane Calcium Entry in the Pancreatic Acinar Cell. *J Biol Chem* 1990 Aug 5;265(22):12846-53.
- (103) Rosado JA, Redondo PC, Sage SO, Pariente JA, Salido GM. Store-operated Ca²⁺ entry: vesicle fusion or reversible trafficking and de novo conformational coupling? *J Cell Physiol* 2005 Nov;205(2):262-9.
- (104) Rosado JA, Sage SO. The actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry. *J Physiol* 2000 Jul 15;526 Pt 2:221-9.
- (105) Morales S, Camello PJ, Alcon S, Salido GM, Mawe G, Pozo MJ. Coactivation of capacitative calcium entry and L-type calcium channels in guinea pig gallbladder. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004 Jun;286(6):G1090-G1100.
- (106) Morales S, Camello PJ, Mawe GM, Pozo MJ. Cyclic AMP-mediated inhibition of gallbladder contractility: role of K⁺ channel activation and Ca²⁺ signaling. *Br J Pharmacol* 2004 Dec;143(8):994-1005.
- (107) Morales S, Camello PJ, Rosado JA, Mawe GM, Pozo MJ. Disruption of the filamentous actin cytoskeleton is necessary for the activation of capacitative calcium entry in naive smooth muscle cells. *Cell Signal* 2005 May;17(5):635-45.
- (108) Morales S, Diez A, Puyet A, Camello PJ, Camello-Almaraz C, Bautista JM, et al. Calcium controls smooth muscle TRPC gene transcription via the CaMK/calcineurin-dependent pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 Jan;292(1):C553-C563.
- (109) Wellner MC, Isenberg G. Stretch Effects on Whole-Cell Currents of Guinea-Pig Urinary-Bladder Myocytes. *Journal of Physiology-London* 1994 Nov 1;480:439-48.
- (110) Setoguchi M, Ohya Y, Abe I, Fujishima M. Stretch-activated whole-cell currents in smooth muscle cells from mesenteric resistance artery of guinea-pig. *Journal of Physiology-London* 1997 Jun 1;501(2):343-53.
- (111) Kuriyama H, Kitamura K, Nabata H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol Rev* 1995 Sep;47(3):387-573.

- (112) Berridge MJ, Irvine RF. Inositol Phosphates and Cell Signaling. *Nature* 1989 Sep 21;341(6239):197-205.
- (113) Lee HC, Aarhus R. A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem* 1995 Feb 3;270(5):2152-7.
- (114) Inui M, Saito A, Fleischer S. Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J Biol Chem* 1987 Feb 5;262(4):1740-7.
- (115) Lai FA, Erickson HP, Rousseau E, Liu QY, Meissner G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 1988 Jan 28;331(6154):315-9.
- (116) Samsó M, Wagenknecht T, Allen PD. Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* 2005 Jun;12(6):539-44.
- (117) Collier ML, Ji G, Wang YX, Kotlikoff MI. Calcium-induced calcium release in smooth muscle - Loose coupling between the action potential and calcium release. *J Gen Physiol* 2000 May;115(5):653-62.
- (118) Moore ED, Voigt T, Kobayashi YM, Isenberg G, Fay FS, Gallitelli MF, et al. Organization of Ca²⁺ release units in excitable smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder. *Biophys J* 2004 Sep;87(3):1836-47.
- (119) Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 2002 Oct;82(4):893-922.
- (120) Lee HC. Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:317-45.
- (121) Perez CF, Marengo JJ, Bull R, Hidalgo C. Cyclic ADP-ribose activates caffeine-sensitive calcium channels from sea urchin egg microsomes. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998 Feb;43(2):C430-C439.
- (122) Copello JA, Barg S, Sonnleitner A, Porta M, az-Sylvester P, Fill M, et al. Differential activation by Ca²⁺, ATP and caffeine of cardiac and skeletal muscle ryanodine receptors after block by Mg²⁺. *J Membr Biol* 2002 May 1;187(1):51-64.
- (123) Lederer JW, Gmosim S, Song LS, Sobie EA, Hartmann H, Lukyanenko V. Ca²⁺ sparks in heart muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2004;25(8):602-3.
- (124) Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, et al. Relaxation of Arterial Smooth-Muscle by Calcium Sparks. *Science* 1995 Oct 27;270(5236):633-7.
- (125) Herrera GM, Heppner TJ, Nelson MT. Voltage dependence of the coupling of Ca²⁺ sparks to BKCa channels in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 Mar;280(3):C481-C490.

- (126) Pozo MJ, Perez GJ, Nelson MT, Mawe GM. Ca²⁺ sparks and BK currents in gallbladder myocytes: role in CCK-induced response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 Jan;282(1):G165-G174.
- (127) Bayguinov O, Hagen B, Bonev AD, Nelson MT, Sanders KM. Intracellular calcium events activated by ATP in murine colonic myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 Jul;279(1):C126-C135.
- (128) Missiaen L, Taylor CW, Berridge MJ. Luminal Ca²⁺ Promoting Spontaneous Ca²⁺ Release from Inositol Trisphosphate-Sensitive Stores in Rat Hepatocytes. *J Physiol* 1992 Sep;455:623-40.
- (129) Hagar RE, Burgstahler AD, Nathanson MH, Ehrlich BE. Type III InsP₃ receptor channel stays open in the presence of increased calcium. *Nature* 1998 Nov 5;396(6706):81-4.
- (130) McDaniel NL, Chen XL, Singer HA, Murphy RA, Rembold CM. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing [Ca²⁺]_i and uncoupling stress from myosin phosphorylation. *Am J Physiol* 1992 Aug;263(2 Pt 1):C461-C467.
- (131) Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, Chen J, Shcheynikov N, Kang SH, et al. Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP₃ receptors. *Cell* 2003 Sep 19;114(6):777-89.
- (132) Thrower EC, Hagar RE, Ehrlich BE. Regulation of Ins(1,4,5)P₃ receptor isoforms by endogenous modulators. *Trends Pharmacol Sci* 2001 Nov;22(11):580-6.
- (133) Hofer AM, Curci S, Machen TE, Schulz I. ATP regulates calcium leak from agonist-sensitive internal calcium stores. *FASEB J* 1996 Feb;10(2):302-8.
- (134) Morales S, Camello PJ, Mawe GM, Pozo MJ. Characterization of intracellular Ca²⁺ stores in gallbladder smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005 Mar;288(3):G507-G513.
- (135) Liang M, Chini EN, Cheng J, Dousa TP. Synthesis of NAADP and cADPR in mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1999 Nov 15;371(2):317-25.
- (136) Lee HC, Aarhus R. A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem* 1995 Feb 3;270(5):2152-7.
- (137) Patel S, Churchill GC, Galione A. Coordination of Ca²⁺ signalling by NAADP. *Trends Biochem Sci* 2001 Aug;26(8):482-9.
- (138) Boittin FX, Galione A, Evans AM. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate mediates Ca²⁺ signals and contraction in arterial smooth muscle via a two-pool mechanism. *Circ Res* 2002 Dec 13;91(12):1168-75.
- (139) Somlyo AP, Somlyo AV. Signal-Transduction and Regulation in Smooth-Muscle. *Nature* 1994 Nov 17;372(6503):231-6.

- (140) Murthy KS. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol* 2006;68:345-74.
- (141) Koehler JA, Baggio LL, Lamont BJ, Ali S, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor activation modulates pancreatitis-associated gene expression but does not modify the susceptibility to experimental pancreatitis in mice. *Diabetes* 2009 Sep;58(9):2148-61.
- (142) Linari G, Agostini S, Amadoro G, Ciotti MT, Florenzano F, Improta G, et al. Involvement of cannabinoid CB1- and CB2-receptors in the modulation of exocrine pancreatic secretion. *Pharmacol Res* 2009 Mar;59(3):207-14.
- (143) Douglas WW. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* 1968 Nov;34(3):451-74.
- (144) Petersen OH. Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J Physiol* 1992 Mar;448:1-51.
- (145) Dufresne M, Seva C, Fourmy D. Cholecystokinin and gastrin receptors. *Physiol Rev* 2006 Jul;86(3):805-47.
- (146) Owyang C, Logsdon CD. New insights into neurohormonal regulation of pancreatic secretion. *Gastroenterology* 2004 Sep;127(3):957-69.
- (147) Ji B, Bi Y, Simeone D, Mortensen RM, Logsdon CD. Human pancreatic acinar cells lack functional responses to cholecystokinin and gastrin. *Gastroenterology* 2001 Dec;121(6):1380-90.
- (148) Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 1991 May 10;252(5007):802-8.
- (149) Williams J, Yule D. Stimulus-Secretion coupling in pancreatic acinar cells. In: Johnson LR, Ghishan FK, Kaunitz JD, Merchant JL, Said HM, Wood JD, editors. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 5 ed. London: Elsevier; 2012. p. 1361-90.
- (150) Trimble ER, Bruzzone R, Meehan CJ, Biden TJ. Rapid increases in inositol 1,4,5-trisphosphate, inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and cytosolic free Ca²⁺ in agonist-stimulated pancreatic acini of the rat. Effect of carbachol, caerulein and secretin. *Biochem J* 1987 Feb 15;242(1):289-92.
- (151) Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 1983 Nov 3;306(5938):67-9.
- (152) Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 1987;56:159-93.
- (153) Matozaki T, Zhu WY, Tsunoda Y, Goke B, Williams JA. Intracellular mediators of bombesin action on rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* 1991 Jun;260(6 Pt 1):G858-G864.

(154) Matozaki T, Williams JA. Multiple sources of 1,2-diacylglycerol in isolated rat pancreatic acini stimulated by cholecystokinin. Involvement of phosphatidylinositol bisphosphate and phosphatidylcholine hydrolysis. *J Biol Chem* 1989 Sep 5;264(25):14729-34.

(155) Loffelholz K. Receptor regulation of choline phospholipid hydrolysis. A novel source of diacylglycerol and phosphatidic acid. *Biochem Pharmacol* 1989 May 15;38(10):1543-9.

(156) Burnham DB, McChesney DJ, Thurston KC, Williams JA. Interaction of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide on function of mouse pancreatic acini in vitro. *J Physiol* 1984 Apr;349:475-82.

(157) Rutten WJ, de Pont JJ, Bonting SL. Adenylate cyclase in the rat pancreas properties and stimulation by hormones. *Biochim Biophys Acta* 1972 Jul 3;274(1):201-13.

(158) Tsunoda Y, Stuenkel EL, Williams JA. Characterization of sustained $[Ca^{2+}]_i$ increase in pancreatic acinar cells and its relation to amylase secretion. *Am J Physiol* 1990 Nov;259(5 Pt 1):G792-G801.

(159) Luik RM, Wu MM, Buchanan J, Lewis RS. The elementary unit of store-operated Ca^{2+} entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol* 2006 Sep 11;174(6):815-25.

(160) Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006 May 11;441(7090):179-85.

(161) Hong JH, Li Q, Kim MS, Shin DM, Feske S, Birnbaumer L, et al. Polarized but differential localization and recruitment of STIM1, Orai1 and TRPC channels in secretory cells. *Traffic* 2011 Feb;12(2):232-45.

(162) Lur G, Haynes LP, Prior IA, Gerasimenko OV, Feske S, Petersen OH, et al. Ribosome-free terminals of rough ER allow formation of STIM1 puncta and segregation of STIM1 from IP(3) receptors. *Curr Biol* 2009 Oct 13;19(19):1648-53.

(163) LeBeau AP, Yule DI, Groblewski GE, Sneyd J. Agonist-dependent phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: A possible mechanism for agonist-specific calcium oscillations in pancreatic acinar cells. *J Gen Physiol* 1999 Jun;113(6):851-72.

(164) Yule DI, Lawrie AM, Gallacher DV. Acetylcholine and cholecystokinin induce different patterns of oscillating calcium signals in pancreatic acinar cells. *Cell Calcium* 1991 Feb;12(2-3):145-51.

(165) Kasai H, Augustine GJ. Cytosolic Ca^{2+} gradients triggering unidirectional fluid secretion from exocrine pancreas. *Nature* 1990 Dec 20;348(6303):735-8.

(166) Rosenzweig SA, Miller LJ, Jamieson JD. Identification and localization of cholecystokinin-binding sites on rat pancreatic plasma membranes and acinar cells: a biochemical and autoradiographic study. *J Cell Biol* 1983 May;96(5):1288-97.

- (167) Kasai H, Li YX, Miyashita Y. Subcellular distribution of Ca²⁺ release channels underlying Ca²⁺ waves and oscillations in exocrine pancreas. *Cell* 1993 Aug 27;74(4):669-77.
- (168) Fogarty KE, Kidd JF, Tuft DA, Thorn P. Mechanisms underlying InsP₃-evoked global Ca²⁺ signals in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol* 2000 Aug 1;526 Pt 3:515-26.
- (169) Yule DI, Ernst SA, Ohnishi H, Wojcikiewicz RJ. Evidence that zymogen granules are not a physiologically relevant calcium pool. Defining the distribution of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 1997 Apr 4;272(14):9093-8.
- (170) Taylor CW, Genazzani AA, Morris SA. Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 1999 Dec;26(6):237-51.
- (171) Finch EA, Turner TJ, Goldin SM. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science* 1991 Apr 19;252(5004):443-6.
- (172) Taylor CW, Laude AJ. IP₃ receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium* 2002 Nov;32(5-6):321-34.
- (173) Park HS, Betzenhauser MJ, Won JH, Chen J, Yule DI. The type 2 inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP₃) receptor determines the sensitivity of InsP₃-induced Ca²⁺ release to ATP in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 2008 Sep 19;283(38):26081-8.
- (174) Ashby MC, Petersen OH, Tepikin AV. Spatial characterisation of ryanodine-induced calcium release in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem J* 2003 Feb 1;369(Pt 3):441-5.
- (175) Straub SV, Giovannucci DR, Yule DI. Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells: functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria. *J Gen Physiol* 2000 Oct;116(4):547-60.
- (176) Thorn P, Gerasimenko O, Petersen OH. Cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist evoked cytosolic Ca²⁺ oscillations in pancreatic acinar cells. *EMBO J* 1994 May 1;13(9):2038-43.
- (177) Galione A, Patel S, Churchill GC. NAADP-induced calcium release in sea urchin eggs. *Biol Cell* 2000 Jul;92(3-4):197-204.
- (178) Yamasaki M, Masgrau R, Morgan AJ, Churchill GC, Patel S, Ashcroft SJ, et al. Organelle selection determines agonist-specific Ca²⁺ signals in pancreatic acinar and beta cells. *J Biol Chem* 2004 Feb 20;279(8):7234-40.
- (179) Cancela JM, Churchill GC, Galione A. Coordination of agonist-induced Ca²⁺-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature* 1999 Mar 4;398(6722):74-6.

- (180) Brailoiu E, Churamani D, Cai X, Schrlau MG, Brailoiu GC, Gao X, et al. Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *J Cell Biol* 2009 Jul 27;186(2):201-9.
- (181) Lee MG, Xu X, Zeng W, Diaz J, Kuo TH, Wuytack F, et al. Polarized expression of Ca²⁺ pumps in pancreatic and salivary gland cells. Role in initiation and propagation of [Ca²⁺]_i waves. *J Biol Chem* 1997 Jun 20;272(25):15771-6.
- (182) Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987;56:395-433.
- (183) Meda P, Findlay I, Kolod E, Orci L, Petersen OH. Short and reversible uncoupling evokes little change in the gap junctions of pancreatic acinar cells. *J Ultrastruct Res* 1983 Apr;83(1):69-84.
- (184) Yule DI, Stuenkel E, Williams JA. Intercellular calcium waves in rat pancreatic acini: mechanism of transmission. *Am J Physiol* 1996 Oct;271(4 Pt 1):C1285-C1294.
- (185) Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 1990;59:971-1005.
- (186) Hand AR, Mednieks MI. Regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase: presence in granules and secretion by exocrine and endocrine cells. *J Cell Sci* 1989 Aug;93 (Pt 4):675-81.
- (187) Holz GG, Kang G, Harbeck M, Roe MW, Chepurny OG. Cell physiology of cAMP sensor Epac. *J Physiol* 2006 Nov 15;577(Pt 1):5-15.
- (188) Newton AC. Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010 Mar;298(3):E395-E402.
- (189) Mochly-Rosen D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 1995 Apr 14;268(5208):247-51.
- (190) Burnham DB, Munowitz P, Thorn N, Williams JA. Protein kinase activity associated with pancreatic zymogen granules. *Biochem J* 1985 May 1;227(3):743-51.
- (191) Bissonnette M, Kuhn D, de LP. Purification and characterization of myosin light-chain kinase from the rat pancreas. *Biochem J* 1989 Mar 15;258(3):739-47.
- (192) Torgerson RR, McNiven MA. Agonist-induced changes in cell shape during regulated secretion in rat pancreatic acini. *J Cell Physiol* 2000 Mar;182(3):438-47.
- (193) Burnham DB, Soling HD, Williams JA. Evaluation of myosin light chain phosphorylation in isolated pancreatic acini. *Am J Physiol* 1988 Jan;254(1 Pt 1):G130-G134.
- (194) Lutz MP, Sutor SL, Abraham RT, Miller LJ. A role for cholecystokinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation in regulated secretion by the pancreatic acinar cell. *J Biol Chem* 1993 May 25;268(15):11119-24.

- (195) Lutz MP, Pinon DI, Miller LJ. Characterization of protein serine/threonine phosphatases in rat pancreas and development of an endogenous substrate-specific phosphatase assay. *Pancreas* 1994 Jul;9(4):418-24.
- (196) Burnham DB. Characterization of Ca²⁺-activated protein phosphatase activity in exocrine pancreas. *Biochem J* 1985 Oct 15;231(2):335-41.
- (197) Sans MD, Williams JA. Calcineurin is required for translational control of protein synthesis in rat pancreatic acini. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004 Aug;287(2):C310-C319.
- (198) McNiven MA, Marlowe KJ. Contributions of molecular motor enzymes to vesicle-based protein transport in gastrointestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1999 Feb;116(2):438-51.
- (199) Jahn R, Scheller RH. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 Sep;7(9):631-43.
- (200) Cohn SM, Birnbaum EH. Colon: Anatomy and structural anomalies. In: Yamada T, editor. *Textbook of gastroenterology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. p. 1685-99.
- (201) Thibodeau G, Patton K. Anatomía del sistema digestivo. In: Thibodeau G, Patton K, editors. *Anatomía y fisiología*. 6 ed. Madrid: Elsevier; 2007. p. 925-60.
- (202) Tortora GJ, Derrickson B. El aparato digestivo. In: Tortora GJ, Derrickson B, editors. *Principios de anatomía y fisiología*. 11 ed. Madrid: Editorial médica panamericana; 2009. p. 901-55.
- (203) Bharucha AE, Brookes S. Neurophysiologic Mechanisms of Human large Intestinal Motility. In: Johnson LR, Ghishan FK, Kaunitz JD, Merchant JL, Said HM, Wood JD, editors. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 5 ed. London: Elsevier; 2012. p. 977-1022.
- (204) Kawasaki K, Min X, Nishiyama A, Sakaguchi E. Effect of fructo-oligosaccharide on nitrogen utilization in guinea pigs. *Animal Science Journal* 2013 Apr 1;84(4):328-33.
- (205) Treuting PM, Dintzis SM. 12 - Lower Gastrointestinal Tract. In: Piper MT, Suzanne D, Denny Liggitt and Charles, Charles WF, editors. *Comparative Anatomy and Histology*. San Diego: Academic Press; 2012. p. 177-92.
- (206) Potter G, Rabb E, Gibbs L, Medlen A. Anatomy of the digestive system of Guinea Pig (*Cavia porcellus*). *Bios* 1956 Dec;27(4):232-4.
- (207) Kurahashi M, Zheng H, Dwyer L, Ward SM, Don KS, Sanders KM. A functional role for the 'fibroblast-like cells' in gastrointestinal smooth muscles. *J Physiol* 2011 Feb 1;589(Pt 3):697-710.
- (208) Sanders KM, Hwang SJ, Ward SM. Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs. *J Physiol* 2010 Dec 1;588(Pt 23):4621-39.

- (209) Camello P, Camello-Almaraz C, Gómez-Pinilla P, Martín-Cano F, Pozo M. Bases neurológicas de la motilidad. In: Tresguerres J, editor. *Fisiología Humana*. 4 ed. México DF: McGraw Hill-Interamericana; 2010. p. 759-70.
- (210) Martin MT, Hove-Madsen L, Jimenez M. Otilonium bromide inhibits muscle contractions via L-type calcium channels in the rat colon. *Neurogastroenterol Motil* 2004 Apr;16(2):175-83.
- (211) Mazzuoli G, Schemann M. Mechanosensitive enteric neurons in the myenteric plexus of the mouse intestine. *PLoS One* 2012;7(7):e39887.
- (212) Okamoto T, Bayguinov PO, Broadhead MJ, Smith TK. Ca(2+) transients in submucous neurons during the colonic migrating motor complex in the isolated murine large intestine. *Neurogastroenterol Motil* 2012 Aug;24(8):769-78, e354.
- (213) Spencer NJ, Kylah M, Wattchow DA, Thomas A, Sia TC, Brookes SJ, et al. Characterization of motor patterns in isolated human colon: are there differences in patients with slow-transit constipation? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012 Jan 1;302(1):G34-G43.
- (214) Fornai M, Antonioli L, Colucci R, Ghisu N, Buccianti P, Marioni A, et al. A1 and A2a receptors mediate inhibitory effects of adenosine on the motor activity of human colon. *Neurogastroenterol Motil* 2009 Apr;21(4):451-66.
- (215) Huizinga JD, Martz S, Gil V, Wang XY, Jimenez M, Parsons S. Two independent networks of interstitial cells of cajal work cooperatively with the enteric nervous system to create colonic motor patterns. *Front Neurosci* 2011;5:93.
- (216) Jiang W, Adam IJ, Kitsanta P, Tiernan J, Hill C, Shorthouse A, et al. 'First-in-man': characterising the mechanosensitivity of human colonic afferents. *Gut* 2011 Feb;60(2):281-2.
- (217) Schemann M. Recording from human gut tissue: a major step towards more efficient drug development? *Gut* 2011 Feb;60(2):151-2.
- (218) Peiris M, Bulmer DC, Baker MD, Boundouki G, Sinha S, Hobson A, et al. Human visceral afferent recordings: preliminary report. *Gut* 2011 Feb;60(2):204-8.
- (219) König H, Liebich H. *Anatomía de los Animales Domésticos*. 2 ed. Editorial Médica Panamericana; 2005.
- (220) Gabella G. The taenia of the rabbit colon, an elastic visceral muscle. *Anat Embryol (Berl)* 1983;167(1):39-51.
- (221) Brown BP, Schrier JE, Berbaum KS, Shirazi SS, Schulze-Delrieu K. Haustral septations increase axial and radial distribution of luminal contents in glass models of the colon. *Am J Physiol* 1995 Nov;269(5 Pt 1):G706-G709.
- (222) Schulze-Delrieu K, Brown BP, Lange W, Custer-Hagen T, Lu C, Shirazi S, et al. Volume shifts, unfolding and rolling of haustra in the isolated guinea pig caecum. *Neurogastroenterol Motil* 1996 Sep;8(3):217-25.

- (223) Kottegoda SR. An analysis of possible nervous mechanisms involved in the peristaltic reflex. *J Physiol* 1969 Feb;200(3):687-712.
- (224) Wood JD, Perkins WE. Mechanical interaction between longitudinal and circular axes of the small intestine. *Am J Physiol* 1970 Mar;218(3):762-8.
- (225) Yokoyama S, North RA. Electrical activity of longitudinal and circular muscle during peristalsis. *Am J Physiol* 1983 Jan;244(1):G83-G88.
- (226) Spencer NJ, Smith TK. Simultaneous intracellular recordings from longitudinal and circular muscle during the peristaltic reflex in guinea-pig distal colon. *J Physiol* 2001 Jun 15;533(Pt 3):787-99.
- (227) Amato A, Cinci L, Rotondo A, Serio R, Fausone-Pellegrini MS, Vannucchi MG, et al. Peripheral motor action of glucagon-like peptide-1 through enteric neuronal receptors. *Neurogastroenterol Motil* 2010 Jun;22(6):664-e203.
- (228) Grider JR. Reciprocal activity of longitudinal and circular muscle during intestinal peristaltic reflex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 May;284(5):G768-G775.
- (229) Spencer NJ, Bayguinov P, Hennig GW, Park KJ, Lee HT, Sanders KM, et al. Activation of neural circuitry and Ca²⁺ waves in longitudinal and circular muscle during CMMCs and the consequences of rectal aganglionosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007 Feb;292(2):G546-G555.
- (230) Rae MG, Fleming N, McGregor DB, Sanders KM, Keef KD. Control of motility patterns in the human colonic circular muscle layer by pacemaker activity. *J Physiol* 1998 Jul 1;510 (Pt 1):309-20.
- (231) Sanders KM, Smith TK. Electrophysiology of colonic smooth muscle. *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2010.
- (232) Bauer AJ, Sanders KM. Gradient in excitation-contraction coupling in canine gastric antral circular muscle. *J Physiol* 1985 Dec;369:283-94.
- (233) Farrugia G, Lei S, Lin X, Miller SM, Nath KA, Ferris CD, et al. A major role for carbon monoxide as an endogenous hyperpolarizing factor in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Jul 8;100(14):8567-70.
- (234) Sha L, Farrugia G, Harmsen WS, Szurszewski JH. Membrane potential gradient is carbon monoxide-dependent in mouse and human small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007 Aug;293(2):G438-G445.
- (235) Sha L, Farrugia G, Linden DR, Szurszewski JH. The transwall gradient across the mouse colonic circular muscle layer is carbon monoxide dependent. *FASEB J* 2010 Oct;24(10):3840-9.
- (236) Sanders KM. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterol Motil* 2008 May;20 Suppl 1:39-53.

(237) Dwyer L, Rhee PL, Lowe V, Zheng H, Peri L, Ro S, et al. Basally activated nonselective cation currents regulate the resting membrane potential in human and monkey colonic smooth muscle. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2011 Aug 1;301(2):G287-G296.

(238) Xiong Z, Sperelakis N, Noffsinger A, Fenoglio-Preiser C. Fast Na⁺ current in circular smooth muscle cells of the large intestine. *Pflügers Arch* 1993 Jun;423(5-6):485-91.

(239) Koh SD, Ward SM, Sanders KM. Ionic conductances regulating the excitability of colonic smooth muscles. *Neurogastroenterology & Motility* 2012 Aug 1;24(8):705-18.

(240) Morgan KG, Muir TC, Szurszewski JH. The electrical basis for contraction and relaxation in canine fundal smooth muscle. *J Physiol* 1981 Feb;311:475-88.

(241) Koh SD, Ward SM, Dick GM, Epperson A, Bonner HP, Sanders KM, et al. Contribution of delayed rectifier potassium currents to the electrical activity of murine colonic smooth muscle. *J Physiol* 1999 Mar 1;515 (Pt 2):475-87.

(242) Huizinga JD, Stern HS, Chow E, Diamant NE, El-Sharkawy TY. Electrophysiologic control of motility in the human colon. *Gastroenterology* 1985 Feb;88(2):500-11.

(243) Duthie HL, Kirk D. Electrical activity of human colonic smooth muscle in vitro. *J Physiol* 1978 Oct;283:319-30.

(244) Dapoigny M, Trolese JF, Bommelaer G, Tournaud R. Myoelectric spiking activity of right colon, left colon, and rectosigmoid of healthy humans. *Dig Dis Sci* 1988 Aug;33(8):1007-12.

(245) Ramón y Cajal S. *Histologie du système nerveux de l'homme et les vertébrés*. Paris: Maloine; 1911.

(246) Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* 2006;68:307-43.

(247) Zhang RX, Wang XY, Chen D, Huizinga JD. Role of interstitial cells of Cajal in the generation and modulation of motor activity induced by cholinergic neurotransmission in the stomach. *Neurogastroenterology & Motility* 2011 Sep 1;23(9):e356-e371.

(248) Goyal RK, Chaudhury A. Mounting evidence against the role of ICC in neurotransmission to smooth muscle in the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010 Jan;298(1):G10-G13.

(249) Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K, et al. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 1992 Oct;116(2):369-75.

- (250) Torihashi S, Ward SM, Nishikawa S, Nishi K, Kobayashi S, Sanders KM. c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 1995 Apr;280(1):97-111.
- (251) Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *J Physiol* 2006 Nov 1;576(Pt 3):721-6.
- (252) Komuro T. Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization. *Microsc Res Tech* 1999 Nov 15;47(4):267-85.
- (253) Komuro T, Seki K, Horiguchi K. Ultrastructural characterization of the interstitial cells of Cajal. *Arch Histol Cytol* 1999 Oct;62(4):295-316.
- (254) Mitsui R, Komuro T. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of wild-type and Ws/Ws rats. *Anat Embryol (Berl)* 2003 May;206(6):453-60.
- (255) Komuro T. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2006 Nov 1;576(Pt 3):653-8.
- (256) Torihashi S, Ward SM, Sanders KM. Development of c-Kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. *Gastroenterology* 1997 Jan;112(1):144-55.
- (257) Young HM, Ciampoli D, Southwell BR, Newgreen DF. Origin of interstitial cells of Cajal in the mouse intestine. *Dev Biol* 1996 Nov 25;180(1):97-107.
- (258) Sanders KM, Ordog T, Koh SD, Torihashi S, Ward SM. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* 1999 Oct;11(5):311-38.
- (259) Fausone-Pellegrini MS, Cortesini C. Ultrastructural features and localization of the interstitial cells of Cajal in the smooth muscle coat of human esophagus. *J Submicrosc Cytol* 1985 Apr;17(2):187-97.
- (260) Hagger R, Gharaie S, Finlayson C, Kumar D. Distribution of the interstitial cells of Cajal in the human anorectum. *J Auton Nerv Syst* 1998 Nov 10;73(2-3):75-9.
- (261) Ishikawa K, Komuro T. Characterization of the interstitial cells associated with the submuscular plexus of the guinea-pig colon. *Anat Embryol (Berl)* 1996 Jul;194(1):49-55.
- (262) Kunisawa Y, Komuro T. Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastric antrum. Distribution and ultrastructure. *Proceedings of the 8APEM* 2004 Jan 1;945-6.
- (263) Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1982;71:1-130.
- (264) Vanderwinden JM, Rumessen JJ, Bernex F, Schiffmann SN, Panthier JJ. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the mouse colon, using antibodies to Kit and Kit(W-lacZ) mice. *Cell Tissue Res* 2000 Nov;302(2):155-70.

(265) Ward SM, Gershon MD, Keef K, Bayguinov YR, Nelson C, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal and electrical activity in ganglionic and aganglionic colons of mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 Aug;283(2):G445-G456.

(266) Horisawa M, Watanabe Y, Torihashi S. Distribution of c-Kit immunopositive cells in normal human colon and in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1998 Aug;33(8):1209-14.

(267) Seki K, Komuro T. Distribution of interstitial cells of Cajal and gap junction protein, Cx 43 in the stomach of wild-type and W/Wv mutant mice. *Anat Embryol (Berl)* 2002 Dec;206(1-2):57-65.

(268) Takaki M. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res* 2003 Oct;39(5):137-61.

(269) Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM. Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* 1994 Oct 1;480 (Pt 1):91-7.

(270) Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995 Jan 26;373(6512):347-9.

(271) Horiguchi K, Semple GS, Sanders KM, Ward SM. Distribution of pacemaker function through the tunica muscularis of the canine gastric antrum. *J Physiol* 2001 Nov 15;537(Pt 1):237-50.

(272) Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat Rec* 2001 Jan 1;262(1):125-35.

(273) Publicover NG, Hammond EM, Sanders KM. Amplification of nitric oxide signaling by interstitial cells isolated from canine colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Mar 1;90(5):2087-91.

(274) Xue C, Pollock J, Schmidt HH, Ward SM, Sanders KM. Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity by interstitial cells of the canine proximal colon. *J Auton Nerv Syst* 1994 Sep;49(1):1-14.

(275) Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoyi M, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci* 2000 Feb 15;20(4):1393-403.

(276) Lavin ST, Southwell BR, Murphy R, Jenkinson KM, Furness JB. Activation of neurokinin 1 receptors on interstitial cells of Cajal of the guinea-pig small intestine by substance P. *Histochem Cell Biol* 1998 Sep;110(3):263-71.

(277) Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999 Feb;295(2):247-56.

- (278) Christensen J. Colonic motility. *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2010.
- (279) Hoff S, Zeller F, von Weyhern CW, Wegner M, Schemann M, Michel K, et al. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol* 2008 Aug 1;509(4):356-71.
- (280) Hoyle CH, Burnstock G. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J Anat* 1989 Oct;166:7-22.
- (281) Timmermans JP, Hens J, Adriaensen D. Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anat Rec* 2001 Jan 1;262(1):71-8.
- (282) Furness JB, Lloyd KC, Sternini C, Walsh JH. Projections of substance P, vasoactive intestinal peptide and tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve fibres in the canine intestine, with special reference to the innervation of the circular muscle. *Arch Histol Cytol* 1990 May;53(2):129-40.
- (283) Porter AJ, Wattachow DA, Brookes SJ, Costa M. Projections of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide-reactive submucosal neurons in the human colon. *J Gastroenterol Hepatol* 1999 Dec;14(12):1180-7.
- (284) Sanders KM, Smith TK. Motoneurons of the submucous plexus regulate electrical activity of the circular muscle of canine proximal colon. *J Physiol* 1986 Nov;380:293-310.
- (285) Dogiel A. Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Sa ügetiere. *Arch Anat Physiol Leipzig* 1899;130-58.
- (286) Brehmer A, Schrod F, Neuhuber W. Morphological classifications of enteric neurons--100 years after Dogiel. *Anat Embryol (Berl)* 1999 Aug;200(2):125-35.
- (287) Furness JB, Bornstein JC, Trussell DC. Shapes of nerve cells in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine revealed by the intracellular injection of dye. *Cell Tissue Res* 1988;254(3):561-71.
- (288) Furness JB, Robbins HL, Xiao J, Stebbing MJ, Nurgali K. Projections and chemistry of Dogiel type II neurons in the mouse colon. *Cell Tissue Res* 2004 Jul;317(1):1-12.
- (289) Wood J. Cellular neurophysiology of enteric neurons. In: Johnson L, editor. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 5 ed. London: Elsevier; 2012. p. 629-69.
- (290) Song ZM, Brookes SJ, Costa M. All calbindin-immunoreactive myenteric neurons project to the mucosa of the guinea-pig small intestine. *Neurosci Lett* 1994 Oct 24;180(2):219-22.
- (291) Porter AJ, Wattachow DA, Brookes SJ, Costa M. The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon. *Gastroenterology* 1997 Dec;113(6):1916-23.

- (292) Wattchow DA, Porter AJ, Brookes SJ, Costa M. The polarity of neurochemically defined myenteric neurons in the human colon. *Gastroenterology* 1997 Aug;113(2):497-506.
- (293) Hwang SJ, Durnin L, Dwyer L, Rhee PL, Ward SM, Koh SD, et al. beta-nicotinamide adenine dinucleotide is an enteric inhibitory neurotransmitter in human and nonhuman primate colons. *Gastroenterology* 2011 Feb;140(2):608-17.
- (294) Jouet P, Sabate JM, Cuillerier E, Coffin B, Lemann M, Jian R, et al. Low-dose lactulose produces a tonic contraction in the human colon. *Neurogastroenterol Motil* 2006 Jan;18(1):45-52.
- (295) Brookes SJ, Chen BN, Hodgson WM, Costa M. Characterization of excitatory and inhibitory motor neurons to the guinea pig lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* 1996 Jul;111(1):108-17.
- (296) Brookes SJ, Costa M. Identification of enteric motor neurones which innervate the circular muscle of the guinea pig small intestine. *Neurosci Lett* 1990 Oct 16;118(2):227-30.
- (297) Brookes SJ, Hennig G, Schemann M. Identification of motor neurons to the circular muscle of the guinea pig gastric corpus. *J Comp Neurol* 1998 Jul 27;397(2):268-80.
- (298) Brookes SJ, Song ZM, Steele PA, Costa M. Identification of motor neurons to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum. *Gastroenterology* 1992 Sep;103(3):961-73.
- (299) Brookes SJ, Steele PA, Costa M. Identification and immunohistochemistry of cholinergic and non-cholinergic circular muscle motor neurons in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 1991;42(3):863-78.
- (300) Neunlist M, Michel K, Aube AC, Galmiche JP, Schemann M. Projections of excitatory and inhibitory motor neurones to the circular and longitudinal muscle of the guinea pig colon. *Cell Tissue Res* 2001 Sep;305(3):325-30.
- (301) Wattchow DA, Brookes SJ, Costa M. The morphology and projections of retrogradely labeled myenteric neurons in the human intestine. *Gastroenterology* 1995 Sep;109(3):866-75.
- (302) Lomax AE, Furness JB. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res* 2000 Oct;302(1):59-72.
- (303) Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 1996 Dec;75(3):949-67.
- (304) Porter AJ, Wattchow DA, Brookes SJ, Costa M. Cholinergic and nitrenergic interneurons in the myenteric plexus of the human colon. *Gut* 2002 Jul;51(1):70-5.
- (305) Anlauf M, Schafer MK, Eiden L, Weihe E. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J Comp Neurol* 2003 Apr 21;459(1):90-111.

- (306) Bayliss WM, Starling EH. The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol* 1899 May 11;24(2):99-143.
- (307) Bayliss WM, Starling EH. The movements and the innervation of the large intestine. *J Physiol* 1900 Dec 31;26(1-2):107-18.
- (308) Langley JN, Magnus R. Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves. *J Physiol* 1905 Sep 8;33(1):34-51.
- (309) Trendelenburg P. Physiological and pharmacological investigations of small intestinal peristalsis. Translation of the article "Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dunndarmperistaltik", *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 81, 55-129, 1917. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006 May;373(2):101-33.
- (310) Hirst GD, Holman ME, Spence I. Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J Physiol* 1974 Jan;236(2):303-26.
- (311) Iyer V, Bornstein JC, Costa M, Furness JB, Takahashi Y, Iwanaga T. Electrophysiology of guinea-pig myenteric neurons correlated with immunoreactivity for calcium binding proteins. *J Auton Nerv Syst* 1988 Mar;22(2):141-50.
- (312) Kunze WA, Furness JB, Bertrand PP, Bornstein JC. Intracellular recording from myenteric neurons of the guinea-pig ileum that respond to stretch. *J Physiol* 1998 Feb 1;506 (Pt 3):827-42.
- (313) Bertrand PP, Kunze WA, Bornstein JC, Furness JB, Smith ML. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am J Physiol* 1997 Aug;273(2 Pt 1):G422-G435.
- (314) Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* 2004 Feb;72(2):143-64.
- (315) Bertrand PP, Bornstein JC. ATP as a putative sensory mediator: activation of intrinsic sensory neurons of the myenteric plexus via P2X receptors. *J Neurosci* 2002 Jun 15;22(12):4767-75.
- (316) Bertrand PP, Kunze WA, Furness JB, Bornstein JC. The terminals of myenteric intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig ileum are excited by 5-hydroxytryptamine acting at 5-hydroxytryptamine-3 receptors. *Neuroscience* 2000;101(2):459-69.
- (317) Cooke HJ, Sidhu M, Wang YZ. Activation of 5-HT_{1P} receptors on submucosal afferents subsequently triggers VIP neurons and chloride secretion in the guinea-pig colon. *J Auton Nerv Syst* 1997 Sep 10;66(1-2):105-10.
- (318) Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 2007 Jan;132(1):397-414.

- (319) Pompolo S, Furness JB. Ultrastructure and synaptic relationships of calbindin-reactive, Dogiel type II neurons, in myenteric ganglia of guinea-pig small intestine. *J Neurocytol* 1988 Dec;17(6):771-82.
- (320) Kunze WA, Furness JB, Bornstein JC. Simultaneous intracellular recordings from enteric neurons reveal that myenteric AH neurons transmit via slow excitatory postsynaptic potentials. *Neuroscience* 1993 Aug;55(3):685-94.
- (321) Stebbing MJ, Bornstein JC. Electrophysiological mapping of fast excitatory synaptic inputs to morphologically and chemically characterized myenteric neurons of guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 1996 Aug;73(4):1017-28.
- (322) Thomas EA, Sjoval H, Bornstein JC. Computational model of the migrating motor complex of the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004 Apr;286(4):G564-G572.
- (323) Bayguinov PO, Hennig GW, Smith TK. Calcium activity in different classes of myenteric neurons underlying the migrating motor complex in the murine colon. *J Physiol* 2010 Feb 1;588(Pt 3):399-421.
- (324) Weidmann S, Schrod F, Neuhuber W, Brehmer A. Quantitative estimation of putative primary afferent neurons in the myenteric plexus of human small intestine. *Histochem Cell Biol* 2007 Nov;128(5):399-407.
- (325) Reed DE, Vanner SJ. Converging and diverging cholinergic inputs from submucosal neurons amplify activity of secretomotor neurons in guinea-pig ileal submucosa. *Neuroscience* 2001;107(4):685-96.
- (326) Furness JB. Intestinofugal neurons and sympathetic reflexes that bypass the central nervous system. *J Comp Neurol* 2003 Jan 13;455(3):281-4.
- (327) Kuntz A, Saccomanno G. REFLEX INHIBITION OF INTESTINAL MOTILITY MEDIATED THROUGH DECENTRALIZED PREVERTEBRAL GANGLIA. *Journal of Neurophysiology* 1944 May 1;7(3):163-70.
- (328) Chen JH, Sallam HS, Lin L, Chen JD. Colorectal and rectocolonic reflexes in canines: involvement of tone, compliance, and anal sphincter relaxation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010 Sep;299(3):R953-R959.
- (329) Law NM, Bharucha AE, Zinsmeister AR. Rectal and colonic distension elicit viscerovisceral reflexes in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 Aug;283(2):G384-G389.
- (330) Hughes SF, Scott SM, Pilot MA, Williams NS. Adrenoceptors and colocolonic inhibitory reflex. *Dig Dis Sci* 1999 Dec;44(12):2462-8.
- (331) Klingele CJ, Bharucha AE, Fletcher JG, Gebhart JB, Riederer SG, Zinsmeister AR. Pelvic organ prolapse in defecatory disorders. *Obstet Gynecol* 2005 Aug;106(2):315-20.

- (332) Lomax AE, Sharkey KA, Furness JB. The participation of the sympathetic innervation of the gastrointestinal tract in disease states. *Neurogastroenterol Motil* 2010 Jan;22(1):7-18.
- (333) Macrae IM, Furness JB, Costa M. Distribution of subgroups of noradrenaline neurons in the coeliac ganglion of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 1986;244(1):173-80.
- (334) Bharucha AE, Camilleri M, Zinsmeister AR, Hanson RB. Adrenergic modulation of human colonic motor and sensory function. *Am J Physiol* 1997 Nov;273(5 Pt 1):G997-1006.
- (335) McRorie J, Krier J, Adams T. Morphology and projections of myenteric neurons to colonic fiber bundles of the cat. *J Auton Nerv Syst* 1991 Mar;32(3):205-15.
- (336) Christensen J, Stiles MJ, Rick GA, Sutherland J. Comparative anatomy of the myenteric plexus of the distal colon in eight mammals. *Gastroenterology* 1984 Apr;86(4):706-13.
- (337) Knowles CH, Scott SM, Lunniss PJ. Slow transit constipation: a disorder of pelvic autonomic nerves? *Dig Dis Sci* 2001 Feb;46(2):389-401.
- (338) Tamura K. Synaptic inputs to morphologically identified myenteric neurons in guinea pig rectum from pelvic nerves. *Am J Physiol* 1997 Jul;273(1 Pt 1):G49-G55.
- (339) Penninckx F, Lestar B, Kerremans R. The internal anal sphincter: mechanisms of control and its role in maintaining anal continence. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1992 Mar;6(1):193-214.
- (340) Lynn PA, Olsson C, Zagorodnyuk V, Costa M, Brookes SJ. Rectal intraganglionic laminar endings are transduction sites of extrinsic mechanoreceptors in the guinea pig rectum. *Gastroenterology* 2003 Sep;125(3):786-94.
- (341) Song X, Chen BN, Zagorodnyuk VP, Lynn PA, Blackshaw LA, Grundy D, et al. Identification of medium/high-threshold extrinsic mechanosensitive afferent nerves to the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2009 Jul;137(1):274-84, 284.
- (342) Hughes PA, Brierley SM, Blackshaw LA. Post-inflammatory modification of colonic afferent mechanosensitivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009 Oct;36(10):1034-40.
- (343) Hughes PA, Brierley SM, Martin CM, Brookes SJ, Linden DR, Blackshaw LA. Post-inflammatory colonic afferent sensitisation: different subtypes, different pathways and different time courses. *Gut* 2009 Oct;58(10):1333-41.
- (344) Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA, Zhou X. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000 Jul 3;81(1-3):97-103.
- (345) Galligan JJ, North RA. Pharmacology and function of nicotinic acetylcholine and P2X receptors in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2004 Apr;16 Suppl 1:64-70.

- (346) Bertrand PP, Galligan JJ. Contribution of chloride conductance increase to slow EPSC and tachykinin current in guinea-pig myenteric neurones. *J Physiol* 1994 Nov 15;481 (Pt 1):47-60.
- (347) Surprenant A, North RA. Mechanism of synaptic inhibition by noradrenaline acting at alpha 2-adrenoceptors. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1988 Jun 22;234(1274):85-114.
- (348) Zafirov DH, Cooke HJ, Wood JD. Elevation of cAMP facilitates noradrenergic transmission in submucous neurons of guinea pig ileum. *Am J Physiol* 1993 Mar;264(3 Pt 1):G442-G446.
- (349) Ward SM, McLaren GJ, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine. *J Physiol* 2006 May 15;573(Pt 1):147-59.
- (350) Makhoulf G. Smooth muscle of the gut. In: Yamada T, editor. *Textbook of gastroenterology*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. p. 92-116.
- (351) Karaus M, Sarna SK. Giant migrating contractions during defecation in the dog colon. *Gastroenterology* 1987 Apr;92(4):925-33.
- (352) Hasler W. Motility of the small intestine and colon. In: Yamada T, editor. *Textbook of gastroenterology*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. p. 220-47.
- (353) Rao SS, Sadeghi P, Beaty J, Kavlock R, Ackerson K. Ambulatory 24-h colonic manometry in healthy humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 Apr;280(4):G629-G639.
- (354) Otterson MF, Sarna SK, Leming SC, Moulder JE, Fink JG. Effects of fractionated doses of ionizing radiation on colonic motor activity. *Am J Physiol* 1992 Oct;263(4 Pt 1):G518-G526.
- (355) Wood J. Integrative functions of the enteric nervous system. In: Johnson L, editor. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 5 ed. London: Elsevier; 2012. p. 671-88.
- (356) Stevens RJ, Publicover NG, Smith TK. Induction and organization of Ca²⁺ waves by enteric neural reflexes. *Nature* 1999 May 6;399(6731):62-6.
- (357) Rey E, Álvarez A, Díaz-Rubio M. Intestino Grueso. In: Tresguerres J, editor. *Fisiología humana*. 4 ed. México DF: Interamericana McGraw-Hill; 2010. p. 790-4.
- (358) Arkwright JW, Underhill ID, Maunder SA, Blenman N, Szczesniak MM, Wiklendt L, et al. Design of a high-sensor count fibre optic manometry catheter for in-vivo colonic diagnostics. *Opt Express* 2009 Dec 7;17(25):22423-31.
- (359) Frieling T, Wood JD, Cooke HJ. Submucosal reflexes: distension-evoked ion transport in the guinea pig distal colon. *Am J Physiol* 1992 Jul;263(1 Pt 1):G91-G96.

- (360) Hendriks R, Bornstein JC, Furness JB. An electrophysiological study of the projections of putative sensory neurons within the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *Neurosci Lett* 1990 Mar 14;110(3):286-90.
- (361) Furness J, Clerc N, Vogalis F, Stebbing M. The enteric nervous system and its extrinsic connections. In: Yamada T, editor. *Textbook of gastroenterology*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. p. 12-34.
- (362) Wood JD. Electrical activity of the intestine of mice with hereditary megacolon and absence of enteric ganglion cells. *Am J Dig Dis* 1973 Jun;18(6):477-88.
- (363) Lyster DJK, Bywater RAR, Taylor GS. Regulation of the frequency of myoelectric complexes in the isolated mouse colon. *J GASTROINTEST MOTIL* 1993;5(3):143-51.
- (364) Lyster DJ, Bywater RA, Taylor GS. Neurogenic control of myoelectric complexes in the mouse isolated colon. *Gastroenterology* 1995 May;108(5):1371-8.
- (365) Powell AK, O'Brien SD, Fida R, Bywater RA. Neural integrity is essential for the propagation of colonic migrating motor complexes in the mouse. *Neurogastroenterol Motil* 2002 Oct;14(5):495-504.
- (366) Abo M, Kono T, Wang Z, Chen JD. Impairment of gastric and jejunal myoelectrical activity during rectal distension in dogs. *Dig Dis Sci* 2000 Sep;45(9):1731-6.
- (367) Ohta D, Ozeki K, Ura K, Tsunoda T, Kanematsu T. Effect of celiac and superior mesenteric ganglionectomy on fasted canine colonic motor activity. *Surg Today* 1995;25(8):717-21.
- (368) Ropert A, Cherbut C, Roze C, Le QA, Holst JJ, Fu-Cheng X, et al. Colonic fermentation and proximal gastric tone in humans. *Gastroenterology* 1996 Aug;111(2):289-96.
- (369) Shafik A. A study of the effect of distension of the rectosigmoid junction on the rectum and anal canal with evidence of a rectosigmoid-rectal reflex. *J Surg Res* 1999 Mar;82(1):73-7.
- (370) Shafik A, El-Sibai O. Effect of sigmoid colon distension on the rectosigmoid junction. Description of the rectosigmoid junction tightening reflex and its clinical implications. *Eur Surg Res* 2000;32(5):310-4.
- (371) Wiley J, Tatum D, Keinath R, Chung OY. Participation of gastric mechanoreceptors and intestinal chemoreceptors in the gastrocolonic response. *Gastroenterology* 1988 May;94(5 Pt 1):1144-9.
- (372) Bjornsson ES, Chey WD, Ladabaum U, Woods ML, Hooper FG, Owyang C, et al. Differential 5-HT₃ mediation of human gastrocolonic response and colonic peristaltic reflex. *Am J Physiol* 1998 Sep;275(3 Pt 1):G498-G505.

(373) Ford MJ, Camilleri M, Wiste JA, Hanson RB. Differences in colonic tone and phasic response to a meal in the transverse and sigmoid human colon. *Gut* 1995 Aug;37(2):264-9.

(374) Furukawa Y, Cook IJ, Panagopoulos V, McEvoy RD, Sharp DJ, Simula M. Relationship between sleep patterns and human colonic motor patterns. *Gastroenterology* 1994 Nov;107(5):1372-81.

(375) Roarty TP, Suratt PM, Hellmann P, McCallum RW. Colonic motor activity in women during sleep. *Sleep* 1998 May 1;21(3):285-8.

(376) Rao SS, Hatfield RA, Suls JM, Chamberlain MJ. Psychological and physical stress induce differential effects on human colonic motility. *Am J Gastroenterol* 1998 Jun;93(6):985-90.

(377) Morrow NS, Garrick T. Effects of intermittent tail shock or water avoidance on proximal colonic motor contractility in rats. *Physiol Behav* 1997 Aug;62(2):233-9.

(378) Oliver MR, Tan DT, Kirk DR, Rioux KP, Scott RB. Colonic and jejunal motor disturbances after colonic antigen challenge of sensitized rat. *Gastroenterology* 1997 Jun;112(6):1996-2005.

(379) Moreels TG, De Man JG, Bogers JJ, De Winter BY, Vrolix G, Herman AG, et al. Effect of *Schistosoma mansoni*-induced granulomatous inflammation on murine gastrointestinal motility. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 May;280(5):G1030-G1042.

(380) Fargeas MJ, Fioramonti J, Bueno L. Involvement of capsaicin-sensitive afferent nerves in the intestinal motor alterations induced by intestinal anaphylaxis in rats. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101(2):190-5.

(381) Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, et al. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol* 2006 Jul;148(5):565-78.

(382) Harrington AM, Hutson JM, Southwell BR. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Prog Histochem Cytochem* 2010 Feb;44(4):173-202.

(383) Chiba T, Bharucha AE, Thomforde GM, Kost LJ, Phillips SF. Model of rapid gastrointestinal transit in dogs: effects of muscarinic antagonists and a nitric oxide synthase inhibitor. *Neurogastroenterol Motil* 2002 Oct;14(5):535-41.

(384) Bharucha AE, Seide B, Guan Z, Andrews CN, Zinsmeister AR. Effect of tolterodine on gastrointestinal transit and bowel habits in healthy subjects. *Neurogastroenterol Motil* 2008 Jun;20(6):643-8.

(385) Harrington AM, Hutson JM, Southwell BR. High affinity choline transporter immunoreactivity in rat ileum myenteric nerves. *Cell Tissue Res* 2007 Mar;327(3):421-31.

- (386) Gillis RA, Dias SJ, Hicks KA, Mangel AW, Pagani FD, Hamilton BL, et al. Inhibitory control of proximal colonic motility by the sympathetic nervous system. *Am J Physiol* 1987 Oct;253(4 Pt 1):G531-G539.
- (387) Tack JF, Wood JD. Actions of noradrenaline on myenteric neurons in the guinea pig gastric antrum. *J Auton Nerv Syst* 1992 Nov;41(1-2):67-77.
- (388) Unnerstall JR, Kopajtic TA, Kuhar MJ. Distribution of alpha 2 agonist binding sites in the rat and human central nervous system: analysis of some functional, anatomic correlates of the pharmacologic effects of clonidine and related adrenergic agents. *Brain Res* 1984 Mar;319(1):69-101.
- (389) Wouters MM, Farrugia G, Schemann M. 5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. *Neurogastroenterol Motil* 2007 Aug;19 Suppl 2:5-12.
- (390) Camilleri M. Is there an experimental basis for the development of ischaemic colitis as a result of 5-HT3 antagonist treatment? *Neurogastroenterol Motil* 2007 Feb;19(2):77-84.
- (391) Bouras EP, Camilleri M, Burton DD, Thomforde G, McKinzie S, Zinsmeister AR. Prucalopride accelerates gastrointestinal and colonic transit in patients with constipation without a rectal evacuation disorder. *Gastroenterology* 2001 Feb;120(2):354-60.
- (392) Deiteren A, De Winter BY, Nullens S, Pelckmans PA, De Man JG. Role of tachykinin receptors in the modulation of colonic peristaltic activity in mice. *Eur J Pharmacol* 2011 Sep 30;667(1-3):339-47.
- (393) Tonini M, Spelta V, De PF, De GR, D'Agostino G, Stanghellini V, et al. Tachykinin-dependent and -independent components of peristalsis in the guinea pig isolated distal colon. *Gastroenterology* 2001 Mar;120(4):938-45.
- (394) Gonne J, Camilleri M, Ferber I, Burton D, Baxter K, Keyashian K, et al. Effect of alvimopan and codeine on gastrointestinal transit: a randomized controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005 Aug;3(8):784-91.
- (395) Szarka LA, Camilleri M, Burton D, Fox JC, McKinzie S, Stanislav T, et al. Efficacy of on-demand asimadoline, a peripheral kappa-opioid agonist, in females with irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007 Nov;5(11):1268-75.
- (396) Dinning PG, Szczesniak M, Cook IJ. Removal of tonic nitrenergic inhibition is a potent stimulus for human proximal colonic propagating sequences. *Neurogastroenterol Motil* 2006 Jan;18(1):37-44.
- (397) Dickson EJ, Spencer NJ, Hennig GW, Bayguinov PO, Ren J, Heredia DJ, et al. An enteric occult reflex underlies accommodation and slow transit in the distal large bowel. *Gastroenterology* 2007 May;132(5):1912-24.
- (398) Thirion L, Pierard-Franchimont C, Arrese JE, Quatresooz P, Gaspard U, Pierard GE. [The skin and menopause]. *Rev Med Liege* 2006 Mar;61(3):159-62.

- (399) Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* 2007 Apr;1100:1-13.
- (400) Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 2010 Apr 16;328(5976):321-6.
- (401) Crimmins EM, Hayward MD, Saito Y. Changing mortality and morbidity rates and the health status and life expectancy of the older population. *Demography* 1994 Feb;31(1):159-75.
- (402) Olshansky SJ, Carnes BA, Desesquelles A. Demography. Prospects for human longevity. *Science* 2001 Feb 23;291(5508):1491-2.
- (403) García-García FJ, Larrión Zugasti JL, Rodríguez Mañas L. Fragilidad: un fenotipo en revisión. *Gaceta Sanitaria* 2011 Dec;25, Supplement 2(0):51-8.
- (404) Growing Older in America: The Health and Retirement Study. National Institute of Aging; 2007.
- (405) Birge SJ. Is there a role for estrogen replacement therapy in the prevention and treatment of dementia? *J Am Geriatr Soc* 1996 Jul;44(7):865-70.
- (406) Olshansky SJ. The law of mortality revisited: interspecies comparisons of mortality. *J Comp Pathol* 2010 Jan;142 Suppl 1:S4-S9.
- (407) Dice JF. Cellular and molecular mechanisms of aging. *Physiol Rev* 1993 Jan;73(1):149-59.
- (408) HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956 Jul;11(3):298-300.
- (409) HARMAN D. Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs Aging* 1993 Jan;3(1):60-80.
- (410) Burcham PC, Kuhan YT. Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malondialdehyde. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Mar 27;220(3):996-1001.
- (411) Feig DI, Loeb LA. Mechanisms of mutation by oxidative DNA damage: reduced fidelity of mammalian DNA polymerase beta. *Biochemistry* 1993 Apr 27;32(16):4466-73.
- (412) Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1987;25(4):317-64.
- (413) Lapointe J, Hekimi S. When a theory of aging ages badly. *Cell Mol Life Sci* 2010 Jan;67(1):1-8.
- (414) Liu J, Mori A. Stress, aging, and brain oxidative damage. *Neurochem Res* 1999 Nov;24(11):1479-97.

- (415) Pamplona R. Mitochondrial DNA damage and animal longevity: insights from comparative studies. *J Aging Res* 2011;2011:807108.
- (416) Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 1999 Nov 18;402(6759):309-13.
- (417) Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE, Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980;15(6):575-91.
- (418) Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 Feb;292(2):C670-C686.
- (419) Corda S, Laplace C, Vicaut E, Duranteau J. Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001 Jun;24(6):762-8.
- (420) Muller FL, Liu Y, Van RH. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2004 Nov 19;279(47):49064-73.
- (421) Berneburg M, Grether-Beck S, Kurten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, et al. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem* 1999 May 28;274(22):15345-9.
- (422) Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 2002 Apr;269(8):1996-2002.
- (423) Kalen A, Appelkvist EL, Dallner G. Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids* 1989 Jul;24(7):579-84.
- (424) de Grey AD. A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging. *Bioessays* 1997 Feb;19(2):161-6.
- (425) Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001 Nov 15;15(22):2922-33.
- (426) Rohme D. Ageing and the fusion sensitivity potential of human cells in culture: relation to tissue origin, donor age, and in vitro culture level and condition. *Mech Ageing Dev* 1981 Jul;16(3):241-53.
- (427) Kipling D, Cooke HJ. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 1990 Sep 27;347(6291):400-2.
- (428) Bernardes de JB, Vera E, Schneeberger K, Tejera AM, Ayuso E, Bosch F, et al. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med* 2012 Aug;4(8):691-704.
- (429) Vera E, Bernardes de JB, Foronda M, Flores JM, Blasco MA. The rate of increase of short telomeres predicts longevity in mammals. *Cell Rep* 2012 Oct 25;2(4):732-7.

(430) Fukuchi K, Martin GM, Monnat RJ, Jr. Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Aug;86(15):5893-7.

(431) Dahl KN, Scaffidi P, Islam MF, Yodh AG, Wilson KL, Misteli T. Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Jul 5;103(27):10271-6.

(432) Braybrooke JP, Li JL, Wu L, Caple F, Benson FE, Hickson ID. Functional interaction between the Bloom's syndrome helicase and the RAD51 paralog, RAD51L3 (RAD51D). *J Biol Chem* 2003 Nov 28;278(48):48357-66.

(433) Ghosh S, Feingold E, Chakraborty S, Dey SK. Telomere length is associated with types of chromosome 21 nondisjunction: a new insight into the maternal age effect on Down syndrome birth. *Hum Genet* 2010 Apr;127(4):403-9.

(434) Tuo J, Jaruga P, Rodriguez H, Bohr VA, Dizdaroglu M. Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine resulting from oxidative stress. *FASEB J* 2003 Apr;17(6):668-74.

(435) Weizman N, Shiloh Y, Barzilai A. Contribution of the Atm protein to maintaining cellular homeostasis evidenced by continuous activation of the AP-1 pathway in Atm-deficient brains. *J Biol Chem* 2003 Feb 28;278(9):6741-7.

(436) Holliday R. Somatic mutations and ageing. *Mutat Res* 2000 Oct;463(3):173-8.

(437) Warner HR. Longevity genes: from primitive organisms to humans. *Mech Ageing Dev* 2005 Feb;126(2):235-42.

(438) Hamet P, Tremblay J. Genes of aging. *Metabolism* 2003 Oct;52(10 Suppl 2):5-9.

(439) Bohr VA, Brosh RM, Jr., von KC, Opresko P, Karmakar P. Pathways defective in the human premature aging disease Werner syndrome. *Biogerontology* 2002;3(1-2):89-94.

(440) Spindler SR. Review of the literature and suggestions for the design of rodent survival studies for the identification of compounds that increase health and life span. *Age (Dordr)* 2012 Feb;34(1):111-20.

(441) Herberg S, Czernichow S, Galan P. Tell me what your blood beta-carotene level is, I will tell you what your health risk is! The viewpoint of the SUVIMAX researchers. *Ann Nutr Metab* 2009;54(4):310-2.

(442) Czernichow S, Couthouis A, Bertrais S, Vergnaud AC, Dauchet L, Galan P, et al. Antioxidant supplementation does not affect fasting plasma glucose in the Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals (SU.VI.MAX) study in France: association with dietary intake and plasma concentrations. *Am J Clin Nutr* 2006 Aug;84(2):395-9.

- (443) Vina J, Lloret A, Orti R, Alonso D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2004 Feb;25(1-2):117-23.
- (444) Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 2008 Aug;8(2):157-68.
- (445) Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006 Nov 16;444(7117):337-42.
- (446) Vendelbo MH, Nair KS. Mitochondrial longevity pathways. *Biochim Biophys Acta* 2011 Apr;1813(4):634-44.
- (447) Pozo MJ, Gomez-Pinilla PJ, Camello-Almaraz C, Martin-Cano FE, Pascua P, Rol MA, et al. Melatonin, a potential therapeutic agent for smooth muscle-related pathological conditions and aging. *Curr Med Chem* 2010;17(34):4150-65.
- (448) Pascua P, Camello-Almaraz C, Camello PJ, Martin-Cano FE, Vara E, Fernandez-Tresguerres JA, et al. Melatonin, and to a lesser extent growth hormone, restores colonic smooth muscle physiology in old rats. *J Pineal Res* 2011 Nov;51(4):405-15.
- (449) Gomez-Pinilla PJ, Gomez MF, Sward K, Hedlund P, Hellstrand P, Camello PJ, et al. Melatonin restores impaired contractility in aged guinea pig urinary bladder. *J Pineal Res* 2008 May;44(4):416-25.
- (450) Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 2008 Jul;85(3):335-53.
- (451) Veldhuis JD, Liem AY, South S, Weltman A, Weltman J, Clemmons DA, et al. Differential impact of age, sex steroid hormones, and obesity on basal versus pulsatile growth hormone secretion in men as assessed in an ultrasensitive chemiluminescence assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 Nov;80(11):3209-22.
- (452) Rudman D. Growth hormone, body composition, and aging. *J Am Geriatr Soc* 1985 Nov;33(11):800-7.
- (453) Takala J, Ruokonen E, Webster NR, Nielsen MS, Zandstra DF, Vundelinckx G, et al. Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. *N Engl J Med* 1999 Sep 9;341(11):785-92.
- (454) Neubauer DN. Sleep problems in the elderly. *Am Fam Physician* 1999 May 1;59(9):2551-60.
- (455) van Geijlswijk IM, Korzilius HP, Smits MG. The use of exogenous melatonin in delayed sleep phase disorder: a meta-analysis. *Sleep* 2010 Dec;33(12):1605-14.

(456) McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition* 1989 May;5(3):155-71.

(457) Camello PJ, Camello-Almaraz C, Pozo MJ. Pharmacological approaches to improve ageing. In: Gallelli L, editor. *Pharmacology*. 1 ed. Rijeka (Croatia): InTech; 2012. p. 257-82.

(458) Anderson RM, Weindruch R. Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. *Trends Endocrinol Metab* 2010 Mar;21(3):134-41.

(459) Xiang L, He G. Caloric restriction and antiaging effects. *Ann Nutr Metab* 2011;58(1):42-8.

(460) Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007 Jun;18(3-4):313-25.

(461) Chiba T, Yamaza H, Shimokawa I. Role of insulin and growth hormone/insulin-like growth factor-I signaling in lifespan extension: rodent longevity models for studying aging and calorie restriction. *Curr Genomics* 2007 Nov;8(7):423-8.

(462) Kapahi P, Chen D, Rogers AN, Katewa SD, Li PW, Thomas EL, et al. With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab* 2010 Jun 9;11(6):453-65.

(463) Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009 May;10(5):307-18.

(464) Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med* 2011 Jun;32(3):159-221.

(465) Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 2010 Apr 2;584(7):1287-95.

(466) Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol* 2007 Aug;21(8):1745-55.

(467) Bamps S, Wirtz J, Savory FR, Lake D, Hope IA. The *Caenorhabditis elegans* sirtuin gene, *sir-2.1*, is widely expressed and induced upon caloric restriction. *Mech Ageing Dev* 2009 Nov;130(11-12):762-70.

(468) Boily G, Seifert EL, Bevilacqua L, He XH, Sabourin G, Estey C, et al. Sirt1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice. *PLoS One* 2008;3(3):e1759.

(469) Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van VE, Czopik A, et al. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling caloric restriction. *Aging Cell* 2007 Dec;6(6):759-67.

- (470) Wang Y, Liang Y, Vanhoutte PM. SIRT1 and AMPK in regulating mammalian senescence: a critical review and a working model. *FEBS Lett* 2011 Apr 6;585(7):986-94.
- (471) Le Couteur DG, McLachlan AJ, Quinn RJ, Simpson SJ, de CR. Aging biology and novel targets for drug discovery. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012 Feb;67(2):168-74.
- (472) Minor RK, Smith DL, Jr., Sossong AM, Kaushik S, Poosala S, Spangler EL, et al. Chronic ingestion of 2-deoxy-D-glucose induces cardiac vacuolization and increases mortality in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010 Mar 15;243(3):332-9.
- (473) Sharp ZD, Richardson A. Aging and cancer: can mTOR inhibitors kill two birds with one drug? *Target Oncol* 2011 Mar;6(1):41-51.
- (474) Baynes JW. From life to death--the struggle between chemistry and biology during aging: the Maillard reaction as an amplifier of genomic damage. *Biogerontology* 2000;1(3):235-46.
- (475) Baynes JW, Thorpe SR. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 2000 Jun 15;28(12):1708-16.
- (476) Yeo EJ, Jang IS, Lim HK, Ha KS, Park SC. Agonist-specific differential changes of cellular signal transduction pathways in senescent human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol* 2002 Jul;37(7):871-83.
- (477) Park WY, Park JS, Cho KA, Kim DI, Ko YG, Seo JS, et al. Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. *J Biol Chem* 2000 Jul 7;275(27):20847-52.
- (478) Hardouin S, Mansier P, Bertin B, Dakhly T, Swynghedauw B, Moalic JM. beta-Adrenergic and muscarinic receptor expression are regulated in opposite ways during senescence in rat left ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 1997 Jan;29(1):309-19.
- (479) Shu Y, Scarpace PJ. Forskolin binding sites and G-protein immunoreactivity in rat hearts during aging. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994 Feb;23(2):188-93.
- (480) Huang HM, Toral-Barza L, Thaler H, Tofel-Grehl B, Gibson GE. Inositol phosphates and intracellular calcium after bradykinin stimulation in fibroblasts from young, normal aged and Alzheimer donors. *Neurobiol Aging* 1991 Sep;12(5):469-73.
- (481) Firth M, Prather CM. Gastrointestinal motility problems in the elderly patient. *Gastroenterology* 2002 May;122(6):1688-700.
- (482) Phillips RJ, Powley TL. As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J Comp Neurol* 2001 Jun 4;434(3):358-77.
- (483) Castell DO. Esophageal disorders in the elderly. *Gastroenterol Clin North Am* 1990 Jun;19(2):235-54.
- (484) Eckardt VF, LeCompte PM. Esophageal ganglia and smooth muscle in the elderly. *Am J Dig Dis* 1978 May;23(5):443-8.

(485) Clarkston WK, Pantano MM, Morley JE, Horowitz M, Littlefield JM, Burton FR. Evidence for the anorexia of aging: gastrointestinal transit and hunger in healthy elderly vs. young adults. *Am J Physiol* 1997 Jan;272(1 Pt 2):R243-R248.

(486) Tang RS, Chan FK. Mechanisms behind the increased vulnerability of the aging stomach to NSAID-related injury: perhaps not as simple as we may think. *Dig Dis Sci* 2013 Jan;58(1):11-2.

(487) Anuras S, Sutherland J. Small intestinal manometry in healthy elderly subjects. *J Am Geriatr Soc* 1984 Aug;32(8):581-3.

(488) Cheskin LJ, Kamal N, Crowell MD, Schuster MM, Whitehead WE. Mechanisms of constipation in older persons and effects of fiber compared with placebo. *J Am Geriatr Soc* 1995 Jun;43(6):666-9.

(489) Liu F, Kondo T, Toda Y. Brief physical inactivity prolongs colonic transit time in elderly active men. *Int J Sports Med* 1993 Nov;14(8):465-7.

(490) Akervall S, Nordgren S, Fasth S, Oresland T, Pettersson K, Hulten L. The effects of age, gender, and parity on rectoanal functions in adults. *Scand J Gastroenterol* 1990 Dec;25(12):1247-56.

(491) Enck P, Kuhlbusch R, Lubke H, Frieling T, Erckenbrecht JF. Age and sex and anorectal manometry in incontinence. *Dis Colon Rectum* 1989 Dec;32(12):1026-30.

(492) McHugh SM, Diamant NE. Effect of age, gender, and parity on anal canal pressures. Contribution of impaired anal sphincter function to fecal incontinence. *Dig Dis Sci* 1987 Jul;32(7):726-36.

(493) Saffrey MJ. Ageing of the enteric nervous system. *Mech Ageing Dev* 2004 Dec;125(12):899-906.

(494) Meciano FJ, Carvalho VC, de Souza RR. Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: a preliminary investigation. *Gerontology* 1995;41(1):18-21.

(495) Gomes OA, de Souza RR, Liberti EA. A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. *Gerontology* 1997;43(4):210-7.

(496) de Souza RR, Moratelli HB, Borges N, Liberti EA. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. *Gerontology* 1993;39(4):183-8.

(497) Madsen JL. Effects of gender, age, and body mass index on gastrointestinal transit times. *Dig Dis Sci* 1992 Oct;37(10):1548-53.

(498) Wade PR. Aging and neural control of the GI tract. I. Age-related changes in the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 Sep;283(3):G489-G495.

- (499) Baker DM, Santer RM. A quantitative study of the effects of age on the noradrenergic innervation of Auerbach's plexus in the rat. *Mech Ageing Dev* 1988 Feb;42(2):147-58.
- (500) Santer RM, Baker DM. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. *J Auton Nerv Syst* 1988 Nov;25(1):59-67.
- (501) Belai A, Cooper S, Burnstock G. Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurones of rat ileum and proximal colon. *Cell Tissue Res* 1995 Feb;279(2):379-83.
- (502) Belai A, Burnstock G. Distribution and colocalization of nitric oxide synthase and calcitonin in myenteric neurons of developing, aging, and Crohn's disease human small intestine. *Dig Dis Sci* 1999 Aug;44(8):1579-87.
- (503) Wade PR, Cowen T. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. *Neurogastroenterol Motil* 2004 Apr;16 Suppl 1:19-23.
- (504) Roberts D, Gelperin D, Wiley JW. Evidence for age-associated reduction in acetylcholine release and smooth muscle response in the rat colon. *Am J Physiol* 1994 Oct;267(4 Pt 1):G515-G522.
- (505) Kobashi YL, Breuing EP, Markus RP. Age-related changes in the reactivity of the rat jejunum to cholinergic agonists. *Eur J Pharmacol* 1985 Sep 24;115(2-3):133-8.
- (506) Hall KE, Wiley JW. Neural injury, repair and adaptation in the GI tract. I. New insights into neuronal injury: a cautionary tale. *Am J Physiol* 1998 Jun;274(6 Pt 1):G978-G983.
- (507) Cowen T, Johnson RJ, Soubeyre V, Santer RM. Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death. *Gut* 2000 Nov;47(5):653-60.
- (508) De Giorgio R, Camilleri M. Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterol Motil* 2004 Oct;16(5):515-31.
- (509) Lock G. Physiology and pathology of the oesophagus in the elderly patient. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001 Dec;15(6):919-41.
- (510) Bitar KN. Aging and neural control of the GI tract: V. Aging and gastrointestinal smooth muscle: from signal transduction to contractile proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 Jan;284(1):G1-G7.
- (511) Larsson L, Salviati G. Effects of age on calcium transport activity of sarcoplasmic reticulum in fast- and slow-twitch rat muscle fibres. *J Physiol* 1989 Dec;419:253-64.
- (512) Lopes GS, Ferreira AT, Oshiro ME, Vladimirova I, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A, et al. Aging-related changes of intracellular Ca²⁺ stores and contractile response of intestinal smooth muscle. *Exp Gerontol* 2006 Jan;41(1):55-62.

(513) Xiong Z, Sperelakis N, Noffsinger A, Fenoglio-Preiser C. Changes in calcium channel current densities in rat colonic smooth muscle cells during development and aging. *Am J Physiol* 1993 Sep;265(3 Pt 1):C617-C625.

(514) Xiong Z, Sperelakis N, Noffsinger A, Fenoglio-Preiser C. Ca²⁺ currents in human colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995 Sep;269(3 Pt 1):G378-G385.

(515) Bitar KN, Ibitayo A, Patil SB. HSP27 modulates agonist-induced association of translocated RhoA and PKC-alpha in muscle cells of the colon. *J Appl Physiol* 2002 Jan;92(1):41-9.

(516) Bitar KN. Aging and Gi smooth muscle fecal incontinence: Is bioengineering an option

3. *Exp Gerontol* 2005 Aug;40(8-9):643-9.

(517) Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 1998 Nov 20;854:410-24.

(518) Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998 Oct;56(3):359-84.

(519) Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson M, Carney J. beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 Apr 29;200(2):710-5.

(520) Chen M, Fernandez HL. Alzheimer movement re-examined 25 years later: is it a "disease" or a senile condition in medical nature? *Front Biosci* 2001 Aug 1;6:E30-E40.

(521) Ghiso J, Frangione B. Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2002 Dec 7;54(12):1539-51.

(522) Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease and related disorders. *Neurol Clin* 2000 Nov;18(4):847-64.

(523) Mayeux R, Sano M. Treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1999 Nov 25;341(22):1670-9.

(524) Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 1992 Dec;32(6):804-12.

(525) Khoo TK, Yarnall AJ, Duncan GW, Coleman S, O'Brien JT, Brooks DJ, et al. The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease. *Neurology* 2013 Jan 15;80(3):276-81.

(526) Et-Taouil K, Safar M, Plante GE. Mechanisms and consequences of large artery rigidity. *Can J Physiol Pharmacol* 2003 Mar;81(3):205-11.

- (527) McLean MR, Goldberg PB, Roberts J. An ultrastructural study of the effects of age on sympathetic innervation and atrial tissue in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1983 Feb;15(2):75-92.
- (528) Lakatta EG, Yin FC. Myocardial aging: functional alterations and related cellular mechanisms. *Am J Physiol* 1982 Jun;242(6):H927-H941.
- (529) Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 2003 Jul;57(5-6):195-202.
- (530) Orlandi A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Spagnoli LG. Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006 Oct;188(2):221-30.
- (531) Li Z, Froehlich J, Galis ZS, Lakatta EG. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension* 1999 Jan;33(1):116-23.
- (532) Kocher O, Skalli O, Bloom WS, Gabbiani G. Cytoskeleton of rat aortic smooth muscle cells. Normal conditions and experimental intimal thickening. *Lab Invest* 1984 Jun;50(6):645-52.
- (533) Lundberg MS, Crow MT. Age-related changes in the signaling and function of vascular smooth muscle cells. *Exp Gerontol* 1999 Jul;34(4):549-57.
- (534) Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quaglino D. Immunological changes in the elderly. *Aging (Milano)* 1999 Oct;11(5):281-6.
- (535) Huether G. The Contribution of Extrapineal Sites of Melatonin Synthesis to Circulating Melatonin Levels in Higher Vertebrates. *Experientia* 1993 Aug 15;49(8):665-70.
- (536) Kvetnoy IM. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochemical Journal* 1999 Jan;31(1):1-12.
- (537) Reiter RJ. Pineal Melatonin - Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions. *Endocr Rev* 1991 May;12(2):151-80.
- (538) Cavallo A. The Pineal-Gland in Human-Beings - Relevance to Pediatrics. *J Pediatr* 1993 Dec;123(6):843-51.
- (539) Haimov I, Lavie P, Laudon M, Herer P, Vigder C, Zisapel I. Melatonin Replacement Therapy of Elderly Insomniacs. *Sleep* 1995 Sep;18(7):598-603.
- (540) Reiter RJ. The Aging Pineal-Gland and Its Physiological Consequences. *Bioessays* 1992 Mar;14(3):169-75.
- (541) Reiter RJ. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol* 1995 May;30(3-4):199-212.

(542) Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC. Melatonin, Hydroxyl Radical-Mediated Oxidative Damage, and Aging - A Hypothesis. *J Pineal Res* 1993 May;14(4):151-68.

(543) Hazlerigg DG, Morgan PJ, Messenger S. Decoding photoperiodic time and melatonin in mammals: What can we learn from the pars tuberalis? *J Biol Rhythms* 2001 Aug;16(4):326-35.

(544) Deacon SJ, Arendt J. Phase-Shifts in Melatonin, 6-Sulphatoxymelatonin and Alertness Rhythms After Treatment with Moderately Bright Light at Night. *Clin Endocrinol* 1994 Mar;40(3):413-20.

(545) Pevet P. Melatonin and biological rhythms. *Therapie* 1998 Sep;53(5):411-20.

(546) Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, et al. The Pineal Hormone Melatonin Inhibits Dna-Adduct Formation Induced by the Chemical Carcinogen Saffrole In-Vivo. *Cancer Letters* 1993 Jun 15;70(1-2):65-71.

(547) Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, El Sawi M. Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration - Implications for aging. *Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process* 2002;959:238-50.

(548) Arendt J, Aldhous M, Wright J. Synchronization of A Disturbed Sleep-Wake Cycle in A Blind Man by Melatonin Treatment. *Lancet* 1988 Apr 2;1(8588):772-3.

(549) Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007 Jan;42(1):28-42.

(550) Arendt J, Deacon S. Treatment of circadian rhythm disorders - Melatonin. *Chronobiol Int* 1997;14(2):185-204.

(551) Petrie K, Conaglen JV, Thompson L, Chamberlain K. Effect of Melatonin on Jet Lag After Long Haul Flights. *Br Med J* 1989 Mar 18;298(6675):705-7.

(552) Cos S, Blask DE. Melatonin Modulates Growth-Factor Activity in Mcf-7 Human Breast-Cancer Cells. *J Pineal Res* 1994 Aug;17(1):25-32.

(553) Lissoni P, Barni S, Cazzaniga M, Ardizzoia A, Rovelli F, Brivio F, et al. Efficacy of the Concomitant Administration of the Pineal Hormone Melatonin in Cancer-Immunotherapy with Low-Dose Il-2 in Patients with Advanced Solid Tumors Who Had Progressed on Il-2 Alone. *Oncology* 1994 Jul;51(4):344-7.

(554) Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cel Mol Life Sci* 2003 Jul;60(7):1407-26.

(555) Garfinkel D, Laudon M, Nof D, Zisapel N. Improvement of Sleep Quality in Elderly People by Controlled-Release Melatonin. *Lancet* 1995 Aug 26;346(8974):541-4.

(556) Voordouw BCG, Euser R, Verdonk RER, Alberda BT, Dejong FH, Drogendijk AC, et al. Melatonin and Melatonin-Progestin Combinations Alter Pituitary-Ovarian Function in Women and Can Inhibit Ovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1992 Jan;74(1):108-17.

(557) Cardinali DP, Brusco LI, Bonacho MG, Esquifino AI. Effect of melatonin on 24-hour rhythms of ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis in submaxillary lymph nodes and spleen of young and aged rats. *Neuroendocrinology* 1998 May;67(5):349-62.

(558) Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Role of the Pineal-Gland in Immunity .3. Melatonin Antagonizes the Immunosuppressive Effect of Acute Stress Via An Opiatergic Mechanism. *Immunology* 1988 Mar;63(3):465-9.

(559) Bubenik GA, Hacker RR, Brown GM, Bartos L. Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *J Pineal Res* 1999 Jan;26(1):56-63.

(560) Lane EA, Moss HB. Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism

1. *J Clin Endocrinol Metab* 1985 Dec;61(6):1214-6.

(561) Huether G. Melatonin Synthesis in the Gastrointestinal-Tract and the Impact of Nutritional Factors on Circulating Melatonin. *Aging Clock* 1994;719:146-58.

(562) Bubenik GA, Pang SF. The Role of Serotonin and Melatonin in Gastrointestinal Physiology - Ontogeny, Regulation of Food-Intake, and Mutual Serotonin-Melatonin Feedback. *J Pineal Res* 1994 Mar;16(2):91-9.

(563) Bubenik GA, Smith PS, Schams D. The Effect of Orally-Administered Melatonin on the Seasonality of Deer Pelage Exchange, Antler Development, Lh, Fsh, Prolactin, Testosterone, T3, T4, Cortisol, and Alkaline-Phosphatase. *J Pineal Res* 1986;3(4):331-49.

(564) BarajasLopez C, Peres AL, EspinosaLuna R, ReyesVazquez C, PrietoGomez B. Melatonin modulates cholinergic transmission by blocking nicotinic channels in the guinea-pig submucous plexus. *Eur J Pharmacol* 1996 Oct 3;312(3):319-25.

(565) Drago F, Macaуда S, Salehi S. Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 2002 Sep;47(9):1969-74.

(566) Cho CH, Pang SF, Chen BW, Pfeiffer CJ. Modulating Action of Melatonin on Serotonin-Induced Aggravation of Ethanol Ulceration and Changes of Mucosal Blood-Flow in Rat Stomachs. *J Pineal Res* 1989;6(1):89-97.

(567) Khan R, Burton S, Morley S, Daya S, Potgieter B. The Effect of Melatonin on the Formation of Gastric Stress Lesions in Rats. *Experientia* 1990 Jan 15;46(1):88-9.

(568) Melchiorri D, Sewerynek E, Reiter RJ, Ortiz GG, Poeggeler B, Nistico G. Suppressive effect of melatonin administration on ethanol-induced gastroduodenal injury in rats in vivo. *Br J Pharmacol* 1997 May;121(2):264-70.

(569) Brzozowski T, Konturek PC, Zwirska-Korczala K, Konturek SJ, Brzozowska I, Drozdowicz D, et al. Importance of the pineal gland, endogenous prostaglandins and sensory nerves in the gastroprotective actions of central and peripheral melatonin against stress-induced damage. *J Pineal Res* 2005 Nov;39(4):375-85.

(570) Kato K, Asai S, Murai I, Nagata T, Takahashi Y, Komuro S, et al. Melatonin's gastroprotective and antistress roles involve both central and peripheral effects. *J Gastroenterol* 2001 Feb;36(2):91-5.

(571) Sener-Muratoglu G, Paskaloglu K, Arbak S, Hurdag C, Ayanoglu-Dulger G. Protective effect of famotidine, omeprazole, and melatonin against acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats. *Dig Dis Sci* 2001 Feb;46(2):318-30.

(572) Bandyopadhyay U, Biswas K, Chatterjee R, Bandyopadhyay D, Chattopadhyay I, Ganguly CK, et al. Gastroprotective effect of Neem (*Azadirachta indica*) bark extract: possible involvement of H(+)-K(+)-ATPase inhibition and scavenging of hydroxyl radical. *Life Sci* 2002 Nov 1;71(24):2845-65.

(573) Bandyopadhyay D, Biswas K, Bandyopadhyay U, Reiter RJ, Banerjee RK. Melatonin protects against stress-induced gastric lesions by scavenging the hydroxyl radical. *J Pineal Res* 2000 Oct;29(3):143-51.

(574) Sjoblom M, Flemstrom G. Melatonin in the duodenal lumen is a potent stimulant of mucosal bicarbonate secretion. *J Pineal Res* 2003 May;34(4):288-93.

(575) Sjoblom M, Jedstedt G, Flemstrom G. Peripheral melatonin mediates neural stimulation of duodenal mucosal bicarbonate secretion. *J Clin Invest* 2001 Aug;108(4):625-33.

(576) Lu WZ, Gwee KA, Moochhalla S, Ho KY. Melatonin improves bowel symptoms in female patients with irritable bowel syndrome: a double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2005 Nov 15;22(10):927-34.

(577) Song GH, Leng PH, Gwee KA, Moochhala SM, Ho KY. Melatonin improves abdominal pain in irritable bowel syndrome patients who have sleep disturbances: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Gut* 2005 Oct;54(10):1402-7.

(578) Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 2003 Aug;8(3):247-83.

(579) Dong WG, Mei Q, Yu JP, Xu JM, Xiang L, Xu Y. Effects of melatonin on the expression of iNOS and COX-2 in rat models of colitis. *World J Gastroenterol* 2003 Jun;9(6):1307-11.

(580) Fuss IJ. Cytokine network in inflammatory bowel disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003 Jun;2(2):101-12.

(581) Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1999 Feb;34(1):66-74.

- (582) Sans M, Panes J, Ardite E, Elizalde JI, Arce Y, Elena M, et al. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 1999 Apr;116(4):874-83.
- (583) Li JH, Yu JP, Yu HG, Xu XM, Yu LL, Liu J, et al. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF-kappaB activation in rats with colitis. *Mediators Inflamm* 2005 Aug 31;2005(4):185-93.
- (584) Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997 Dec;92(12 Suppl):5S-11S.
- (585) Fraschini F, Demartini G, Esposti D, Scaglione F. Melatonin involvement in immunity and cancer. *Biol Signals Recept* 1998 Jan;7(1):61-72.
- (586) Maestroni GJ, Conti A. Anti-stress role of the melatonin-immuno-opioid network: evidence for a physiological mechanism involving T cell-derived, immunoreactive beta-endorphin and MET-enkephalin binding to thymic opioid receptors. *Int J Neurosci* 1991 Dec;61(3-4):289-98.
- (587) Maestroni GJM. kappa-opioid receptors in marrow stroma mediate the hematopoietic effects of melatonin-induced opioid cytokines. *Neuroimmunomodulation* 1998;840:411-9.
- (588) Calvo JR, Guerrero JM, Osuna C, Molinero P, Carrillo-Vico A. Melatonin triggers Crohn's disease symptoms. *J Pineal Res* 2002 May;32(4):277-8.
- (589) Marquez E, Sanchez-Fidalgo S, Calvo JR, la de Lastra CA, Motilva V. Acutely administered melatonin is beneficial while chronic melatonin treatment aggravates the evolution of TNBS-induced colitis. *J Pineal Res* 2006 Jan;40(1):48-55.
- (590) Skwarlo-Sonta K. Melatonin in immunity: comparative aspects. *Neuro Endocrinol Lett* 2002 Apr;23 Suppl 1:61-6.
- (591) Maestroni GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs* 2001 Mar;10(3):467-76.
- (592) Miles LE, Dement WC. Sleep and aging. *Sleep* 1980;3(2):1-220.
- (593) Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med* 1996;20(3):351-9.

Justificación y objetivos



El envejecimiento de la población ha sido uno de los eventos demográficos más distintivos del siglo XX y de acuerdo con el incremento previsto en la expectativa de vida, la población anciana constituirá el 20% de la población total mundial en 50 años. El envejecimiento se entiende como un proceso lento, gradual y pasivo influenciado por la interrelación de múltiples factores relacionados con la genética del individuo y el medio ambiente. Está aceptado que el envejecimiento no es una enfermedad, pero la división entre envejecimiento normal y patológico es realmente estrecha y gran cantidad de ancianos sufren las denominadas “enfermedades relacionadas con el envejecimiento” entre las que se encuentran trastornos neurodegenerativos, enfermedad cardiovascular, diabetes, incontinencia y trastornos gastrointestinales. Estas enfermedades contribuyen a la incapacidad, disminución en calidad de vida y elevados costes en los sistemas públicos de salud, por lo que es necesario investigar en las bases celulares y moleculares del envejecimiento para identificar así dianas terapéuticas y desarrollar tratamientos que mitiguen sus efectos en los diferentes tejidos.

Con respecto al tracto gastrointestinal (GI), la prevalencia de disfunciones motoras aumenta en ancianos. Las áreas de mayor riesgo en el desarrollo de disfunciones relacionadas con la edad son la orofaringe, el esófago y el tracto digestivo distal (colon y recto). Dos patrones motores básicos, de propulsión y mezcla, posibilitan las funciones del colon. El establecimiento de patrones motores gastrointestinales coordinados requiere la interacción compleja entre varios tipos celulares: nervios, células musculares lisas y células intersticiales de Cajal (ICCs). Existen pocas evidencias experimentales del papel que la mucosa y el plexo submucoso puedan jugar en el control de la motilidad colónica. La actividad motora propulsiva implica la activación del circuito del reflejo peristáltico: en un punto dado, el estiramiento de la pared y la liberación de serotonina por células enterocromafines activa neuronas aferentes primarias intrínsecas (IPANs) que, a su vez, activan otras IPANs e interneuronas ascendentes o descendentes. Las interneuronas de proyección oral activan neuronas motoras excitatorias, mientras que las de proyección aboral activan neuronas motoras inhibitorias, resultando en un gradiente de presión y actividad motora propulsiva.

La mayor parte de los trabajos sobre envejecimiento en el tracto gastrointestinal están dedicados al estudio de los cambios estructurales del SNE y ICCs, principales reguladores de la motilidad, pero no se han estudiado apenas las alteraciones de la función motora y los mecanismos celulares subyacentes.

Dentro de las enfermedades asociadas al envejecimiento, el Párkinson es la que desarrolla con más consistencia una sintomatología de tipo gastrointestinal. En esta patología neurodegenerativa, el colon sufre alteraciones en los plexos nerviosos consistentes en la aparición de cuerpos de Lewy en las neuronas, estando correlacionada la cantidad de inclusiones de este tipo con la severidad de la constipación que se observa en este órgano. No existen estudios funcionales en modelos experimentales de Párkinson que aclaren las alteraciones funcionales que subyacen en esa constipación.

La mitocondria representa el eje fundamental en una de las principales teorías de envejecimiento, suponiendo la principal fuente de especies reactivas de oxígeno para la célula. A

pesar de ello, el estudio de la implicación de esta organela en el proceso de envejecimiento se encuentra aún en estadios iniciales. No existen tampoco datos sobre estrés oxidativo en las capas musculares del colon a pesar de que se ha demostrado que la mucosa se puede alterar, permitiendo la entrada de agentes invasores al ambiente subepitelial y en consecuencia generando desequilibrios en el estrés oxidativo de las capas musculares.

Por otra parte, estudios previos de nuestro laboratorio demostraban que el envejecimiento disminuye las señales de calcio en el páncreas exocrino y el potencial de membrana mitocondrial, pero se desconocen posibles alteraciones en la dinámica subcelular de esta señal.

Por ello, en la presente tesis se plantean los siguientes **objetivos**:

1. Caracterizar el posible papel de las capas mucosa y submucosa en patrones motores del colon, cambios relacionados con la edad en dichos efectos y mejoras de la función por el tratamiento con melatonina.
2. Estudio del efecto del envejecimiento sobre parámetros oxidativos, inflamatorios y apoptóticos, adicionalmente, evaluar el estatus mitocondrial y su contribución como soporte energético de la contracción.
3. Determinar si enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad, como el Parkinson desarrollan signos de disfunción colónica en fases tempranas que pudieran ser susceptibles de ser utilizados como marcadores de detección precoz de la enfermedad.
4. Determinar si hay alteraciones en la polarización de la señal intracelular de calcio y en su transmisión como onda asociadas al envejecimiento.

Material y métodos

A blue square containing the Roman numeral IV in white serif font.

IV

Cada uno de los trabajos que integran la presente memoria incluye un apartado en el que se detallan debidamente el material y los métodos utilizados para su desarrollo, por lo que no se ha creído conveniente reincidir en los mismos

Trabajos experimentales



Journal of Pineal Research (Sent for publication)

MELATONIN INCREASES SPONTANEOUS COLONIC CONTRACTIONS AND PERISTALSIS IN OLD MICE: THE ROLE OF THE MUCOSA

Francisco E. Martín-Cano, Pedro J. Camello and María J. Pozo*

Dept of Physiology, Faculty of Nursing and Occupational Therapy, University of
Extremadura, 10003 Cáceres, Spain

Running head: Melatonin & colonic motor patterns in old mice

***Correspondence to:**

María J. Pozo
Department of Physiology
Faculty of Nursing and OT
Avda Universidad s/n
10003 Cáceres
Spain
Phone: ++ 34-927-257450
Fax: ++ 34-927-257451
E-mail: mjpozo@unex.es

Keywords: aging, colon, melatonin, mice, mucosa, peristalsis, spontaneous phasic contractions.

CONTENTS

- 1.- Abstract
- 2.- Introduction
- 3.- Material and methods
 - 3.1.- Animals
 - 3.2.- Contraction recording of colonic smooth muscle strips
 - 3.3.- Peristalsis recording in the whole colon
 - 3.4.- Solutions and drugs
 - 3.5.- Data analysis
- 4.- Results
 - 4.1.- Melatonin reduces aging-induced impairment of spontaneous rhythmic contractions from proximal colon
 - 4.2.- Effects of mucosa on SRCs
 - 4.3.- Influence of enteric neurotransmitters in the mucosa-induced enhancement of SRCs
 - 4.4.- Effects of aging and melatonin treatment on colonic peristalsis
- 5.- Discussion
 - 5.1.- Role of the mucosa on colonic SPCs
 - 5.2.- Age-induced changes in peristalsis and the effects of melatonin treatment
- 6.- Acknowledgements
- 7.- Author contributions
- 8.- Reference List

1. Abstract

Evidence for the role of the mucosa on colonic motility is lacking. In the elderly, age-induced changes in motility delays colonic transit leading to constipation. Our aims are to determine the role of the mucosa in spontaneous phasic contractions (SPCs) and the effects of aging and melatonin treatment on both mucosal role and peristalsis. Young and aged ICR-CD1 mice (2-5 and 22-24 mo old, respectively) were studied. A group of old mice was treated with melatonin (10 mg/kg/day). Isometric recording was used to record contractility in full thickness (FT) and mucosa free (MF) strips from proximal and distal colon, and video imaging of the colonic wall movements was used to generate spatio-temporal maps of peristalsis. Proximal FT strips showed higher SPCs than MF strips that was decreased by age and recovered by melatonin treatment. Mucosal effect was related to the inhibition of nitrergic and other inhibitory enteric nerves, as suggested by the effects of neuronal blockers. Distal mucosa had no effects on colonic motility. Peristaltic waves, at a frequency of 1.1 events/min, were recorded in all experimental groups. In aged colon the speed and progression of peristaltic waves were significantly lower, suggesting aged-related impairment in propulsive colonic motility. In conclusion, our study shows for the first time an age-dependent prokinetic role of proximal mucosa in the control of SCPs. In addition, melatonin treatment recovers the excitatory role of the mucosa and improves colonic peristalsis. This supports the use of melatonin to ameliorate alterations in colonic transit and constipation.

2. Introduction

Colonic motility is the result of the orchestrated activation of several cellular types located in the different layers of the colon, similar to the motor activity of other parts of the digestive tract (1). In the colon, motor patterns (segmentation, peristalsis and colonic migrating complexes, CMCs) ensure the absorption of water and electrolytes and the correct formation, storage and progression of the faecal content. Alterations of these patterns will be associated to constipation or diarrhoea (2).

The primary motor engine for the digestive system is the coordinated contraction and relaxation of the circular and longitudinal smooth muscle layers (reviewed in (3)). It has been known for decades that propagating motor activity of the colon (such as peristalsis and CMCs) rely on intrinsic neuronal reflexes leading to an ascending and descending phased release of neurotransmitters on the smooth muscle layers that result in ascending contraction and descending relaxation of the colon (reviewed in (4)). CMC, a fasting motor activity, is an intrinsic neural excitation that causes an ICC-mediated slow wave depolarization that induces rapidly moving slow wave-associated contractions that form a slowly moving complex (5;6). These complexes are inhibited in the presence of the neuronal blocker tetrodotoxin (TTX), which points out to its neural origin (7). In addition, isometric recordings of small pieces of the colon wall (strips) show uncoordinated spontaneous contractility that relies in the inputs from ICC (8) and is modulated by the enteric nervous system (9;10). This activity is not neural in origin as demonstrate the fact that it remains in the presence of TTX (9;11).

The mucosa of the intestine contains enterochromaffin cells that produce serotonin (5-HT) (12). This autacoid plays an important role in colonic sensitivity and motility (13). In fact, it has been proposed as the signal that initiates the activation of the peristaltic reflex when distension of the intestinal wall occurs or chemical substances are in contact with the mucosa (14;15). According to this, mucosa would have a role in the control of intestinal motility, although the few reports that investigate its motor role did not find any change in motility when colonic motility was recorded in the presence or absence of this layer (16). Recently, it has been demonstrated a decrease in the CMC propagation velocity when the mucosa and submucosal layers were removed (17).

Aging of the gastrointestinal has been associated to changes in the defecation patterns, mainly constipation (18;19), as the result of neurodegeneration in animals (20;21) and humans (22). We have demonstrated that an increase in oxidative stress occurs in the colon wall of aged rats and that the treatment with melatonin reverts this to the levels of oxidation found in young animals (23). When we characterized the mucosal availability of 5-HT and melatonin we found that aging caused an increase of both substances in the intestinal mucosa (24), which could be a response induced by the age-induced decrease in blood melatonin (25). In this aged animals, treatment with melatonin suppressed natural gastrointestinal production of 5-HT and melatonin (24). Whether these changes in the mucosal content of 5-HT and melatonin have any effect on colonic motility is still unknown. Thus, the main purpose of this paper is to unveil the role of the mucosa in

the control of colonic motility in young and old mice and to investigate the effects of melatonin treatment on it. Age-related changes in peristalsis and the effects of melatonin are also investigated.

3. Material and Methods

3.1. Animals

Male and female Swiss ICR:CD-1 mice were divided into two groups according to age: young adults (2–5- months-old) and aged (22–24- months-old). Animals were housed in light (12 hr light–12 hr dark cycle)- and temperature (20°C)-controlled rooms and had free access to food. Water access was restricted to the dark cycle. A group of aged animals received melatonin (10 mg/kg/day) for 8-10 months dissolved in the drinking water. The concentration was adjusted for the daily water intake and determined separately for males and females prior to the initiation of the treatment. Melatonin was dissolved in ethanol, and the final ethanol concentration in the drinking water was 0.07%. Untreated animals also received this concentration of ethanol.

Experimental protocols including animal killing were performed following ethical guidelines of the Ethical Committee of the University of Extremadura. After anaesthesia with isoflurane, mice were killed by cervical transection and the colon was immediately removed and placed in cold Krebs-Henseleit solution (K-HS).

3.2. Contraction recording of colonic smooth muscle strips

The whole colon was cleaned of fatty tissue, cut open longitudinally along the mesenteric border, and the proximal and distal colon were identified. Circularly

orientated strips (~5 x 10 mm) of both proximal and distal colon were cut and placed vertically in a 5 ml organ bath filled with K-HS maintained at 37 °C and gassed with 95% O₂ - 5% CO₂. These strips contained all the layers of the colon (mucosa, submucosa with the submucosal plexus, circular muscle, myenteric plexus, longitudinal muscle and serosa) and we will refer them as full thickness strips (FT). In order to study the influence of the mucosa on colonic motility, we pinned the proximal or distal segments as a flat sheet, and pinched the mucosal surface with fine dissection forceps to remove carefully the mucosal layer leaving intact the underlying submucosal plexus. Throughout the results

we will refer to this preparation as mucosa-free strips (MF).

Isometric contractions were measured using force displacement transducers, digitized using a MacLab hardware unit and dedicated software (ADInstruments; Colorado Spring, CO, USA). The muscle strips were mounted under an initial resting tension equivalent to 0.5 g load and allowed to equilibrate for 60 min, with solution changes every 20 min. Strips displayed spontaneous contractility at the resting period. At the end of each experiment the strips were dried and weighed and measured to normalize the

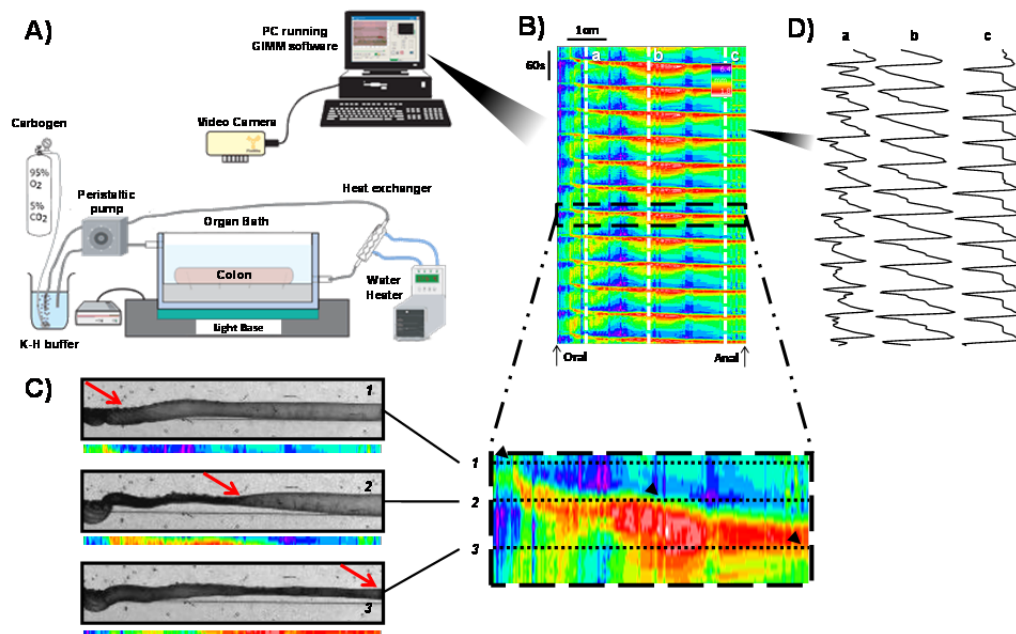


Fig. 1. Generation and analysis of spatio-temporal maps with GastroIntestinal Motility Monitor (GIMM) setup. (A) Schematic diagram representing the components of GIMM experimental setup. (B) Representative spatio-temporal map generated from a mouse colon showing the diameter variations (color code) occurred along the colon (horizontal axis) in a period of 10 minutes (vertical axis). (C) Magnification of a single colon migrating complex (CMC) with video captions at different time points (1,2 & 3 horizontal black dashed lines). A color-coded representation of the colonic diameter in this particular time point is placed below each caption. Red arrows in the video captions and black arrowheads in the CMC magnification mark the progression of the CMC. (D) Changes in diameter at particular points (a, b & c: vertical white dashed lines) could be converted to time-plots by decoding color scale pixels into diameters.

contractile responses.

3.3. Peristalsis recording in the whole colon

After removing adhering connective and fat tissues, either the full colon or shorter segments of at least 6 cm were placed in a heated organ chamber (36.5–37°C) illuminated from beneath and continuously perfused with K-HS at 37°C bubbled with 95% O₂/5% CO₂. The segments were secured at both ends with pins and were not allowed to shorten. The lumen of the colon was also perfused with bubbled K-HS at 37°C at the rate of 1 mL/min (see Fig. 1A).

The peristaltic waves were recorded by video imaging using the Gastrointestinal Motility Monitor (GIMM, Med-Associates Inc, Saint Albans, VT, USA). In brief, this system consists of a video camera positioned above the organ chamber to record images of the colon at 15 frames per second (Fig. 1A). The video camera is connected to a computer where dedicated software analyzes the images and constructs the spatio-temporal maps of changes in colonic diameters due to peristaltic waves over time. Thus, every image of the colon in each frame was converted to a binary silhouette and the diameters at each point along the segment were represented as a color scale value and plotted in a row (under each colon images in Fig. 1C). The smaller diameter (fully contracted) was coded as white and the largest (dilated) as dark blue (see scale in Fig. 1B). Rows of pixels were plotted to construct a map where x-axis represents the position along the colon and y-axis represents time (Fig. 1B). Changes in the diameter at a specific point of the colon over time (Fig. 1D) represent the isotonic recording of contractility at that point.

3.4. Solutions and drugs

The K-HS contained (in mM): 113 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, and 11.5 D-glucose. This solution had a final pH of 7.35 after equilibration with 95% O₂-5% CO₂.

Drug concentrations are expressed as final bath concentrations of active species. Drugs and chemicals were obtained from the following sources: atropine, bethanechol, guanethidine, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), and melatonin were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO); tetrodotoxin citrate was from Tocris Cookson (Bristol, UK). Other chemicals used were of analytical grade from Panreac (Barcelona, Spain).

3.5. Data analysis

Results are expressed as means ± S.E.M. of 6–12 colons or 4–12 colonic strips from 53 animals. Colonic strip tension is given in millinewtons (mN). As we compared results from strips that could have different thickness (since young and old animals are used in the study), we normalized colonic tension data by cross sectional area (CSA (mm²) = weight (g)/specific density × length (mm), density = 1g/mm³). Spontaneous contractions were measured as the area under the curve (AUC) in mN per mm² of tissue and s (mN/mm².s). A 5-min interval was selected for analysis in control conditions. When the effects of antagonists of enteric neurotransmission were assayed the drug was incubated for 20 min and the last 5-min period was analyzed. The effects of the antagonists are expressed as the percentage of change, taking as 100% the AUC of the 5-min period previous to the incubation with the drugs.

Regarding the analysis of the spatio-temporal maps, the following parameters were calculated: frequency, the number of CMCs at the initial part of proximal colon (7 mm apart from the beginning) per min; progression, percentage of the colonic length covered by the CMCs; speed, mm that CMCs cover per second; resting diameter, mean of diameter of the colon in the

intervals between CMCs; amplitude, reduction in the diameter of the colon expressed as the percentage of resting diameter.

Statistical differences between multiple groups were tested using either one or two way analysis of variance for repeated measures (ANOVA) followed by planned

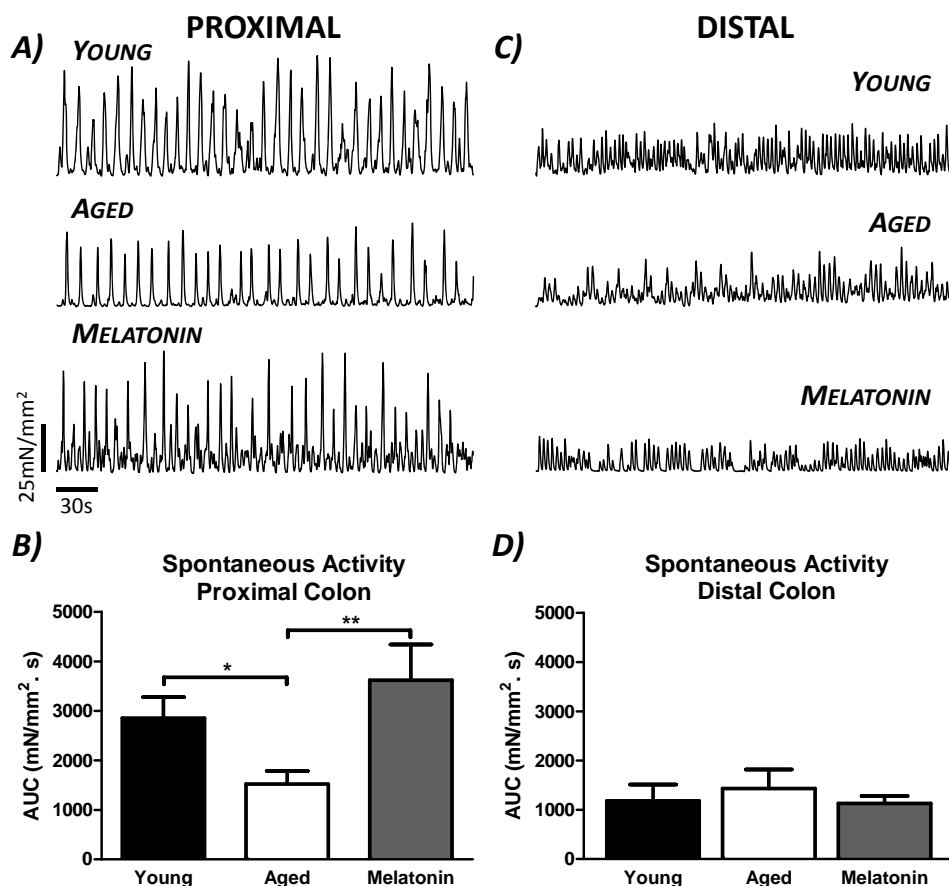


Fig. 2. Aging reduces SPCs in proximal colon but has no effects on distal one. Melatonin treatment achieves functional recovery of proximal mucosa. **(A)** Original isometric contraction recordings from circular-orientated proximal colon muscle strips. The figure shows spontaneous activity registered from full thickness (FT) strips representatives from each experimental group (Young, Aged and Melatonin). **(B)** Histogram (mean \pm sem) showing the mean area under the curve (AUC) measured in 5 minutes from full thickness (FT) strips in the three experimental groups. (* $P < 0.05$ / ** $P < 0.005$, Planned comparisons unpaired Student's t-test) (n: 8-11). **(C)** Original isometric contraction recordings from circular-orientated distal colon muscle strips. The figure shows spontaneous activity registered from full thickness (FT) strips representatives from each experimental group (Young, Aged and Melatonin). **(D)** Histogram (mean \pm sem) showing the mean area under the curve (AUC) measured in 5 minutes from full thickness (FT) strips in the three experimental groups (n: 5-12).

comparisons t-test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

4. Results

4.1. Melatonin reduces aging-induced impairment of spontaneous rhythmic contractions from proximal colon

Full thickness (FT) proximal colonic strips displayed spontaneous rhythmic contractions that consisted in transitory increases of tension from the basal tone. The basal tone was reduced by age and restored by melatonin treatment (young: 24.48 ± 2.89 ; aged: 14.85 ± 2.73 ; melatonin: 25.51 ± 2.69 mN/mm²; $P < 0.05$ young vs aged, $P < 0.01$ melatonin vs aged). In this segment of the colon, high amplitude/low frequency contractions are recorded superimpose to the normal SPCs (Fig. 2A, Table 1). Aged

animals presented the lowest values of amplitude and frequency in this type of SPCs (Table 1). Considering all contractile activity, aged colon had SRCs of lower frequency and amplitude than young animals, and melatonin increased those parameters, although the differences were not statistically significant (Table 2). When spontaneous activity was quantified by the AUC, which includes both amplitude and frequency, the data clearly demonstrate an age-induced reduction in this colonic motor pattern and that melatonin treatment significantly increases SRCs to values close to those of young mice (Fig. 2B).

In FT strips from distal colon, important changes in SRCs were observed. Firstly, the high amplitude contractions were not recorded and there was a clear reduction in the frequency of contractions in all

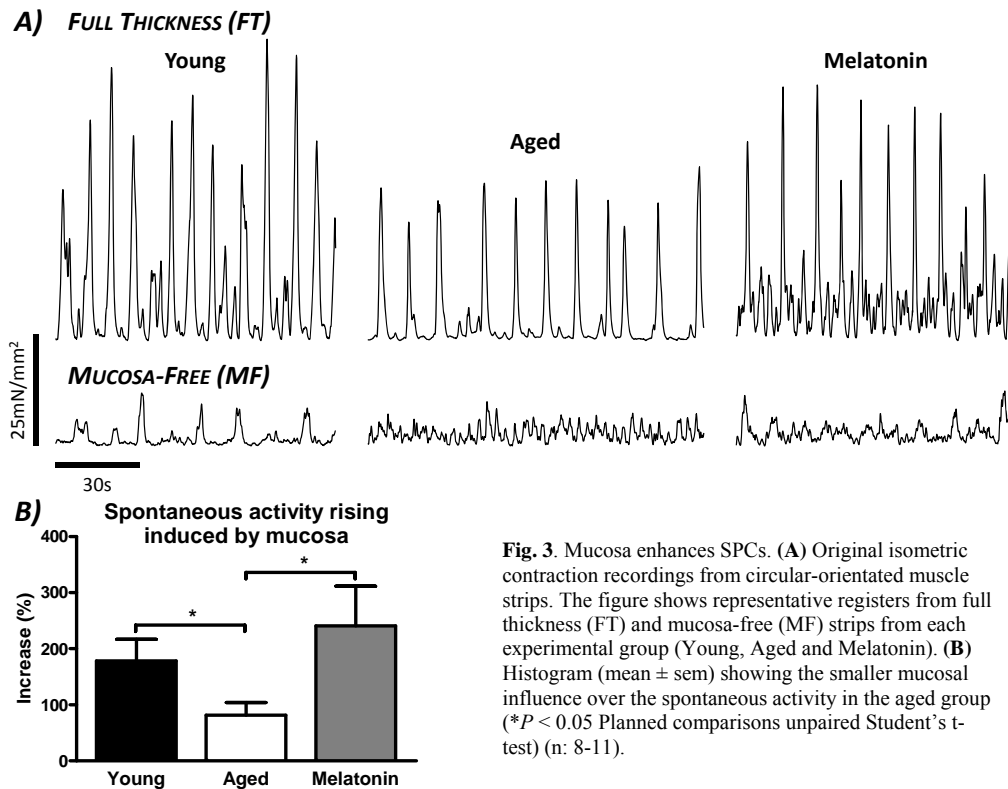


Fig. 3. Mucosa enhances SPCs. (A) Original isometric contraction recordings from circular-orientated muscle strips. The figure shows representative registers from full thickness (FT) and mucosa-free (MF) strips from each experimental group (Young, Aged and Melatonin). (B) Histogram (mean \pm sem) showing the smaller mucosal influence over the spontaneous activity in the aged group ($*P < 0.05$ Planned comparisons unpaired Student's t-test) (n: 8-11).

experimental groups compared to proximal strips (Table 2, Fig. 2C). Secondly, when the AUC of SRCs was calculated, no significant differences related to age or treatment were found (Fig. 2D).

4.2. Effects of mucosa on SRCs

In order to study whether mucosa has influence on colonic contractility, mucosa-free (MF) strips were mounted in the organ bath and their activity was compared with those of FT strips. In Fig. 3A, original tension recordings from proximal FT and MF strips clearly evidence that proximal mucosa has a positive effect on SRCs in all groups of mice, being the amplitude of SRCs the parameter mainly enhanced. When the AUC was calculated and compared between both strip types, increases of 178, 81 and 240 % were found in young, aged and melatonin-treated aged colon (Fig. 3B), indicating that aging impairs the mucosal influence on SRCs from proximal colon. However, the mucosa-induced enhancement was not present in the distal colon in any of

the groups, since although rises of 21, 83 and 14 % were found for the different groups, none of which were statistically significant (Figure 4B).

4.3. Influence of enteric neurotransmitters in the mucosa-induced enhancement of SRCs

To know whether the influence of mucosa was due to the release of any neurotransmitter from the enteric nervous system, we incubated both types of strips with antagonists of the main neurotransmitters. In strips from young animals, incubation with 1 μ M atropine and 100 μ M guanethidine, to block cholinergic and adrenergic nerves and establish non-adrenergic non-cholinergic (NANC) conditions, induced a reduction in AUC consistent with the excitatory character of these nerves. This effect occurred in both strip types, 24% (n.s.) and 40% ($P < 0.01$) of reduction for FT and MF strips, respectively. In aged animals, the contribution of NANC innervation was smaller, 10% (n.s.) and 19%

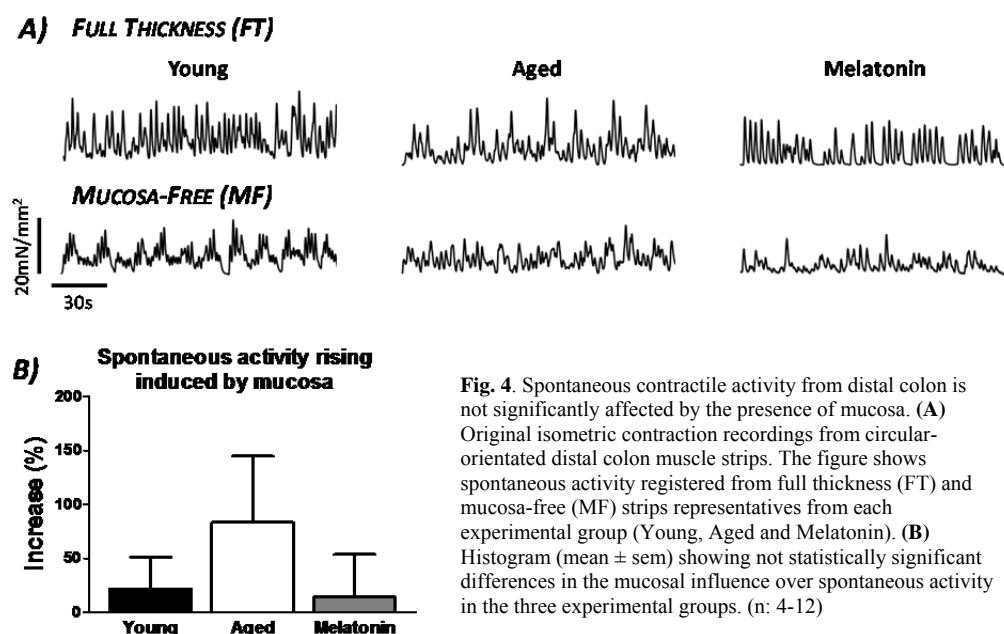


Fig. 4. Spontaneous contractile activity from distal colon is not significantly affected by the presence of mucosa. **(A)** Original isometric contraction recordings from circular-orientated distal colon muscle strips. The figure shows spontaneous activity registered from full thickness (FT) and mucosa-free (MF) strips representatives from each experimental group (Young, Aged and Melatonin). **(B)** Histogram (mean \pm sem) showing not statistically significant differences in the mucosal influence over spontaneous activity in the three experimental groups. (n: 4-12)

($P < 0.05$) of reduction for FT and MF strips, respectively, and increased under melatonin treatment, 18% (n.s.) and 41% ($P < 0.05$) of reduction for FT and MF strips, respectively. Nitrergic nerves are the most important inhibitory innervation in the control of colonic motility patterns. When strips were incubated with the inhibitor of the nitric oxide synthase, L-NAME (100 μM), a significant increase in the AUC of SRCs occurred in all strips types (young: 68%, $P < 0.05$ and 150%, ($P < 0.02$), for FT and MF strips, respectively; aged: 63%, $P < 0.001$ and 115%, $P < 0.001$, for FT and MF strips, respectively; melatonin: 98%, $P < 0.001$ and 147%, $P < 0.01$ for FT and MF strips, respectively. Note that in all experimental groups, the presence of mucosa reduced the effect of L-NAME, and that in aged strips the nitrergic influence is weaker than in young and melatonin groups. When the strips were treated with the Na^+ channel blocker tetrodotoxin (1 μM , TTX) to abolish neural influence in the control of SRCs, the SRCs persisted. In strips devoid of mucosa TTX always induced an increase in the AUC of SRCs, (15%, 35% and 18% for young, aged, and melatonin, an effect

that was significant for all experimental groups ($P < 0.05$). In FT strips, the effect of TTX was a reduction in the AUC in young and melatonin treated strips (7 and 10%, respectively), and a week increase in aged strips (5%).

4.4. Effects of aging and melatonin treatment on colonic peristalsis

Peristalsis recording is a valuable method to evaluate changes in propulsive activity of the colon due to a physiological condition as aging or the treatment of aged animals with melatonin. When we video-recorded the movements of the whole mouse colon from the three experimental groups in basal conditions (Fig. 6A), spontaneous peristaltic waves, mainly initiated at the oral end of the proximal colon, had a similar frequency in the different groups (young: 1.16 ± 0.16 , aged: 1.18 ± 0.09 , melatonin: 1.13 ± 0.16 events min^{-1} , n.s., Fig. 6B) and propagated aborally with a well organised pattern in young animals. This was not the case for aged animals that presented a disorganized pattern of peristaltic waves that mostly did not progress through the distal colon (Fig. 6A). Melatonin treatment

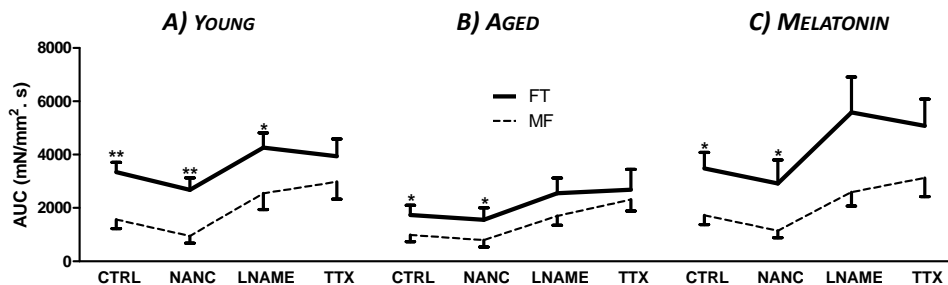


Fig. 5. Pharmacological dissection of mucosa-induced enhancement of SPCs in proximal colon. (A,B,C) Trend graphs representing the SPCs (as AUC) from full thickness (Solid line) and mucosa-free (Dashed line) muscle strips from the three experimental groups in control conditions and under cumulative treatment with blockers of enteric neurotransmission: atropine+guanethidine (1 μM and 100 μM , respectively) to block cholinergic and adrenergic nerves and establish non-adrenergic non-cholinergic conditions, L-NAME (100 μM) to block nitric nerves and tetrodotoxin (1 μM TTX) to block the rest of active enteric nerves. Every point represent the mean \pm sem of the area under the curve registered in the last 5 min of treatment. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$ paired Student's t-test planned comparisons post test 2 way ANOVA) (n: 8-11).

recovered the age-related amelioration in colonic peristalsis. The analysis of the spatio-temporal maps indicated that the peristaltic waves travel through the colon at higher speed in young animals and that melatonin treatment increases, although not significantly, the speed that was clearly reduced by aging ($P < 0.05$, Fig. 6C). An important parameter in peristalsis studies is the progression of the peristaltic contraction, which was significantly reduced in aged animals compared to the young ones (50 ± 4.46 vs 80.75 ± 7.75 mm s⁻¹, $P < 0.01$, Fig. 6D). In animals treated with melatonin, the progression of the contractile wave was similar to that found in young animals (72.22 ± 10.75 mm s⁻¹, Fig. 6D). During the intervals of contractions, the diameter at the initial part of the proximal colon (resting diameter) was more dilated in aged animals ($P < 0.05$ vs young & melatonin, Fig. 6E) but the peristaltic contraction caused similar reduction compared to the resting diameter (around 37 % in all groups, Fig. 6F).

The perfusion of the colon at higher pressure (2 cm of H₂O), or the perfusion of the organ chamber with 100 μM bethanechol or 100 μM L-NAME, caused a significant increase in the speed and progression of the contractile wave in the aged group, whereas in the other groups changes were not statistically significant. In all experimental groups TTX abolish peristalsis.

5. Discussion

This study shows, for the first time, that SFCs of proximal colon are decreased by age, which can be recovered by melatonin treatment. The target for both, age and melatonin, is the mucosa, that exerts prokinetic effects on the tunica muscularis of the proximal colon through a neurogenic

mechanism that involves inhibitory neurotransmitters. Peristaltic waves propagate to a lesser extent and speed through the colon in aged animals, and melatonin is able to improve this colonic motor pattern.

5.1 Role of the mucosa on colonic SPCs

The occurrence of SPCs in the colon of experimental animal models and humans is well established (9;16;26-29) as well as the role of ICCs as pacemakers to induce oscillations in membrane potential of smooth muscle and, as result, smooth muscle contraction (8;26;27). The contribution of the enteric nervous system as a regulatory element of SPCs has also been extensively studied (9;16), which is supported by the role of ICCs in motor neurotransmission (reviewed in (30)). Data in this paper also support a role for ENS in the control of SPCs.

Evidence of the effects of other layers of the colon wall, such as the mucosa, is lacking. So far, the only data available gives to the mucosa no role in the control of SPCs, since the properties of SPCs were the same for both intact and mucosal layer removed preparations from the flexure region of the guinea pig colon(16). Data from rat proximal colon describe SPCs with higher amplitude in myenteric than in FT strips ((8). However, these results are not comparable to ours since myenteric strips lack both mucosa and submucosal layers, whereas our MF strips only lack mucosa. Conversely to that published, here we describe a clear excitatory role for the mouse mucosa of proximal colon that enhances SPCs and basal tension in young and melatonin-treated animals more than 175%. This effect is responsible for the higher contractility recorded in FT strips

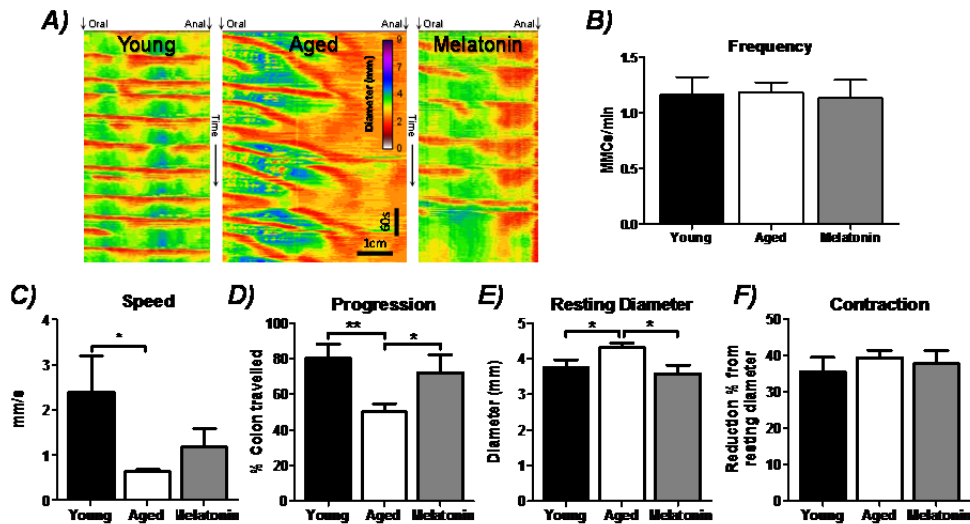


Fig. 6. Basic characteristics of colonic motor complexes (CMCs) in each experimental group (A) Representative spatio-temporal maps from each experimental group. (B) The frequency of CMC generation is not affected by age. Histogram showing the mean \pm sem of the frequency of CMCs generation in each group. (C) In control conditions, age reduces the speed of progression of CMCs and melatonin increases not significantly this speed. Histogram showing the mean \pm sem of the velocity of CMCs in each group. (* $P < 0.05$ Planned comparisons, Unpaired Student's t-test). (D) Progression of the motor complexes is shorter in aged animals and melatonin increases the parameter. Histogram showing the mean \pm sem of the progression of CMCs along the colon in each group young (* $P < 0.05$ / $**P < 0.01$ Planned comparisons, Unpaired Student's t-test). (E) Resting diameter is more dilated in aged animals. Histogram showing the mean \pm sem of the resting diameter of the colon in each group (* $P < 0.05$ Planned comparisons, Unpaired Student's t-test) (F) Contraction generated by the propagation of the CMCs is similar in all groups. Histogram showing the mean \pm sem of the contraction expressed as a reduction percentage of the resting diameter in each group. (n: 5-13).

from proximal colon compared to the distal ones in the three experimental groups. Thus, in distal colon where the mucosa lacks the enhancer effect, there are not statistically differences in SPCs and basal tone between experimental groups and type of strips. The fact that distal mucosa did not showed any age-related change could be explained by our previous finding that distal colon is better able to cope with aging (23).

An important finding in our study is that the mucosa of aged animals has a weak effect as promoter of colonic motility or basal tension, and that melatonin treatment is able to increase the positive role of the aged mucosa in colonic motility indexes. We have previously reported that aging induces oxidative stress in the muscularis

externa of the colon as consequence of an increase in H_2O_2 content and lipid peroxidation that correlated with enhanced expression of pro-inflammatory and pro-apoptotic agents (23). Mitochondrial dysfunction, decline of antioxidant capability and increase of apoptosis are important facts for the aging of human colonic epithelium that results in epithelial damage (31) concomitant to delayed mucosal regeneration. (32). It is possible then that oxidative stress and epithelial damage/regeneration would impair the prokinetic effects of proximal colonic mucosa.

This is supported by the recovery induced by melatonin treatment, an agent with antioxidant, anti-inflammatory and anti

apoptotic properties in digestive tissues (23;33-35). Aging induces an increase in melatonin and 5-HT availability of the intestinal mucosa, as an intent to compensate for the decrease in blood melatonin (24). Interestingly, we demonstrated that melatonin supplementation in these aged mice caused complex decreases in 5-HT and melatonin availability in the GI tract, which may contribute to its therapeutic effects. Taking into account that we have studied the same strain of mice in this paper, the beneficial effects of melatonin in colonic motility would coincide with melatonin-induced decreases in mucosal availability of 5-HT and melatonin.

Regarding the mechanisms underlying the prokinetic effects of the mucosa, our data demonstrate that the enteric nervous system can be the effector of the mucosa. Out of the different components of the ENS, cholinergic and adrenergic nerves do not seem to play a role in the stimulatory effect observed for the mucosa, since similar effects were found in both FT and MF strips after incubation with atropine and guanethidine. The contribution of these nerves to SPCs is smaller in aged animals, which agrees with the significant loss of cholinergic neurons described in rat (21) and human colon (22) and the fall in the density of myenteric neurons found in the aged guinea pigs (20).

Nitroergic nerves seems to play a role in the enhancer effect of the proximal mucosa as demonstrates the different effect of its blocker (L-NAME) on SPCs from MF or FT strips. Thus, in all experimental groups and type of strips, L-NAME induced an increase in SPCs that agrees with the inhibitory character of nitric oxide (NO).

However, the increase is always higher in strips without mucosa, what suggest that mucosa increases SPCs and basal tone as the result of a tonic inhibition of nitroergic nerves. The effect of the mucosa on myenteric plexus could be exerted by intrinsic primary afferent neurons (IPANs) that connect both layers and 5-HT could be its mediator. More studies are needed to validate this hypothesis.

SPCs are still recorded in the presence of the neuronal blocker TTX, what indicates that the origin of this motor pattern is other than the enteric nervous system, in agreement with previous studies (9;12). However, TTX has opposite effects on SPCs from young and melatonin strips regarding the presence of mucosa: in MF strips the blocker induces an increase in motor activity but in FT strips TTX reduces spontaneous contractility. This suggests that in these experimental groups, inhibitory nerves, different from nitroergic ones, are active and reduce SPCs whereas its blockade increases this phasic activity. TTX-induced reduction in FT strips is only explicated if mucosa was also inhibiting these inhibitory nerves or stimulating excitatory ones different from cholinergic or adrenergic fibres that are already inhibited. Purinergic neurotransmission, and the gaseous neurotransmitters sulfidric acid and carbon monoxide that have been shown to play an important role in the control of colonic motility (36-38) could be under the influence of the mucosa. In aged strips the mucosa does have a weaker excitatory effect and the contribution of nitroergic and other inhibitory nerves is smaller, which would explain both the reduced increase induced by L-Name and the small increase in SPCs in response to TTX. Once again, melatonin

treatment is able to restore mucosa and its influence on CPSs through inhibitory nerves, indicating that melatonin is able to improve age-induced amelioration of spontaneous colonic phasic activity.

5.2. Age-induced changes in peristalsis and the effects of melatonin treatment

All the contractile, pacemaker and regulatory elements in the wall of the colon act co-ordinately to induce motor patterns that aim to mix and propel luminal colonic content.

Elderly individuals present decreased propulsive motility of the colon, and this alteration has been associated with neurological (19) and endocrine-paracrine changes in the colonic wall (39). By now, our study is the first evidence for age-related changes in propulsive motor patterns in mice, a valuable model for studying aging due to either genetic manipulations to accelerate aging or their shorter lifespan compared to other rodents. We describe here that aging induces disorganization in the propagation of the peristaltic waves that propagates to lower speed than in young animals and do not progress to the distal colon. In addition, the resting diameter is higher in aged mice what agrees with the smaller basal tone that present aged strips. However, the reduction of diameter induced by the peristaltic wave is similar in the different experimental groups, which points out to a functional redundancy in the elements that control colonic motility that would preserve basic colonic motor patterns to ensure colonic function. In agreement with this, when manoeuvres that speed peristalsis (increases in perfusion pressure and treatment with L-NAME or bethanechol) were applied to the colon of

the three experimental groups, only aged colon showed a clear improvements in peristalsis. In agreement with previous work, peristalsis relies in the enteric nervous system as TTX abolish this motor pattern (7;40;41).

Melatonin treatment almost restored all the age-induced impairments in fluid-induced peristalsis, which confirms its utility as treatment to slow aging of the colon. In conclusion, our study is pioneer showing an excitatory role of the mucosa in the control of SPCs and basal tone of the proximal colon that is age-dependent and exerted through the inhibition of nitregic and other inhibitory enteric nerves. The impairment in the enhancer effect of the mucosa could collaborate in the alterations of peristalsis in aged-colon that improves in response to manoeuvres that increase contractility. Melatonin treatment restores mucosa-induced enhancement of basal tension and CPCs and improves peristalsis of the colon. According to these beneficial effects of melatonin, this indolamine should be considered as a valuable pharmacological tool against colonic motor dysfunction in the elderly.

6. Acknowledgements

We thank the technical support of P. Delgado y F. Barriga. Supported by BFU2007-60563, BFU2011-24365, RETICEF RD12/0043/0016, FEDER and Junta de Extremadura (GR10009).

7. Author contributions

María J Pozo and Pedro J Camello performed the study design. Francisco E. Martín-Cano and María J. Pozo carried out

data collection. Francisco E. Martin-Cano analyzed data. Francisco E. Martin-Cano and Pedro J Camello performed statistical analysis and data interpretation.

María J Pozo and Pedro J Camello and Francisco E. Martin-Cano were involved in manuscript

Preparation. Each author has seen and approved the submitted manuscript.

8. Reference List

- (1) Huizinga JD, Lammers WJ. Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009 Jan;296(1):G1-G8.
- (2) Bharucha AE. Lower gastrointestinal functions. *Neurogastroenterol Motil* 2008 May;20 Suppl 1:103-13.
- (3) Sarna SK. Physiology and pathophysiology of colonic motor activity (1). *Dig Dis Sci* 1991 Jun;36(6):827-62.
- (4) Bornstein JC, Costa M, Grider JR. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol Motil* 2004 Apr;16 Suppl 1:34-8.
- (5) Bayguinov PO, Hennig GW, Smith TK. Ca²⁺ imaging of activity in ICC-MY during local mucosal reflexes and the colonic migrating motor complex in the murine large intestine. *J Physiol* 2010 Nov 15;588(Pt 22):4453-74.
- (6) Huizinga JD, Martz S, Gil V, Wang XY, Jimenez M, Parsons S. Two independent networks of interstitial cells of cajal work cooperatively with the enteric nervous system to create colonic motor patterns. *Front Neurosci* 2011;5:93.
- (7) Fida R, Lyster DJ, Bywater RA, Taylor GS. Colonic migrating motor complexes (CMMCs) in the isolated mouse colon. *Neurogastroenterol Motil* 1997 Jun;9(2):99-107.
- (8) Alberti E, Mikkelsen HB, Wang XY, Diaz M, Larsen JO, Huizinga JD, et al. Pacemaker activity and inhibitory neurotransmission in the colon of Ws/Ws mutant rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007 Jun;292(6):G1499-G1510.
- (9) Auli M, Martinez E, Gallego D, Opazo A, Espin F, Marti-Gallostra M, et al. Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol* 2008 Dec;155(7):1043-55.
- (10) Gallego D, Gil V, Aleu J, Martinez-Cutillas M, Clave P, Jimenez M. Pharmacological characterization of purinergic inhibitory neuromuscular transmission in the human colon. *Neurogastroenterol Motil* 2011 Aug;23(8):792-e338.
- (11) Pluja L, Fernandez E, Jimenez M. Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO. *Br J Pharmacol* 1999 Feb;126(4):883-92.
- (12) BARTER R, PEARSE AG. Detection of 5-hydroxytryptamine in mammalian enterochromaffin cells. *Nature* 1953 Oct 31;172(4383):810.
- (13) Gershon MD. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2013 Feb;20(1):14-21.
- (14) Heredia DJ, Dickson EJ, Bayguinov PO, Hennig GW, Smith TK. Localized release of serotonin (5-hydroxytryptamine) by a fecal pellet regulates migrating motor complexes in murine colon. *Gastroenterology* 2009 Apr;136(4):1328-38.
- (15) Grider JR, Piland BE. The peristaltic reflex induced by short-chain fatty acids is mediated by sequential release of 5-HT and neuronal CGRP but not BDNF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007 Jan;292(1):G429-G437.
- (16) Fujimoto H, Shigemasa Y, Suzuki H. Properties of spontaneous contractions and their modulation by transmural nerve

stimulation in circular smooth muscle isolated from the pacemaker area in the flexure region of the guinea-pig colon. *J Smooth Muscle Res* 2010;46(6):293-308.

(17) Spencer NJ, Nicholas SJ, Robinson L, Kyloh M, Flack N, Brookes SJ, et al. Mechanisms underlying distension-evoked peristalsis in guinea pig distal colon: is there a role for enterochromaffin cells? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011 Sep;301(3):G519-G527.

(18) Camilleri M, Cowen T, Koch TR. Enteric neurodegeneration in ageing. *Neurogastroenterol Motil* 2008 Apr;20(4):418-29.

(19) Wiskur B, Greenwood-Van MB. The aging colon: the role of enteric neurodegeneration in constipation. *Curr Gastroenterol Rep* 2010 Dec;12(6):507-12.

(20) Peck CJ, Samsuria SD, Harrington AM, King SK, Hutson JM, Southwell BR. Fall in density, but not number of myenteric neurons and circular muscle nerve fibres in guinea-pig colon with ageing. *Neurogastroenterol Motil* 2009 Oct;21(10):1075-e90.

(21) Phillips RJ, Kieffer EJ, Powley TL. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Auton Neurosci* 2003 Jul 31;106(2):69-83.

(22) Bernard CE, Gibbons SJ, Gomez-Pinilla PJ, Lurken MS, Schmalz PF, Roeder JL, et al. Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. *Neurogastroenterol Motil* 2009 Jul;21(7):746-e46.

(23) Pascua P, Camello-Almaraz C, Camello PJ, Martín-Cano FE, Vara E, Fernández-Tresguerres JA, et al. Melatonin, and to a lesser extent growth hormone, restores colonic smooth muscle physiology in old rats. *J Pineal Res* 2011 Nov;51(4):405-15.

(24) Bertrand PP, Bertrand RL, Camello PJ, Pozo MJ. Simultaneous measurement of serotonin and melatonin from the intestine of old mice: the effects of daily

melatonin supplementation. *J Pineal Res* 2010 Aug;49(1):23-34.

(25) Bubenik GA, Konturek SJ. Melatonin and aging: prospects for human treatment. *J Physiol Pharmacol* 2011 Feb;62(1):13-9.

(26) Yoneda S, Fukui H, Takaki M. Pacemaker activity from submucosal interstitial cells of Cajal drives high-frequency and low-amplitude circular muscle contractions in the mouse proximal colon. *Neurogastroenterol Motil* 2004 Oct;16(5):621-7.

(27) Pluja L, Alberti E, Fernández E, Mikkelsen HB, Thuneberg L, Jiménez M. Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 Jul;281(1):G255-G266.

(28) Hasler WL, Kurosawa S, Chung OY. Regional cholinergic differences between distal and proximal colonic myenteric plexus. *Am J Physiol* 1990 Mar;258(3 Pt 1):G404-G410.

(29) Carbone SE, Dinning PG, Costa M, Spencer NJ, Brookes SJ, Wattchow DA. Ascending excitatory neural pathways modulate slow phasic myogenic contractions in the isolated human colon. *Neurogastroenterol Motil* 2013 May 1.

(30) Sanders KM, Hwang SJ, Ward SM. Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs. *J Physiol* 2010 Dec 1;588(Pt 23):4621-39.

(31) Li M, Xiao ZQ, Chen ZC, Li JL, Li C, Zhang PF, et al. Proteomic analysis of the aging-related proteins in human normal colon epithelial tissue. *J Biochem Mol Biol* 2007 Jan 31;40(1):72-81.

(32) Sipos F, Leiszter K, Tulassay Z. Effect of ageing on colonic mucosal regeneration. *World J Gastroenterol* 2011 Jul 7;17(25):2981-6.

(33) Pozo MJ, Gomez-Pinilla PJ, Camello-Almaraz C, Martín-Cano FE, Pascua P, Rol MA, et al. Melatonin, a potential therapeutic agent for smooth muscle-related pathological

conditions and aging. *Curr Med Chem* 2010;17(34):4150-65.

(34) Gomez-Pinilla PJ, Camello PJ, Pozo MJ. Protective effect of melatonin on Ca²⁺ homeostasis and contractility in acute cholecystitis. *J Pineal Res* 2008 Apr;44(3):250-60.

(35) Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Age-related alterations in Ca²⁺ signals and mitochondrial membrane potential in exocrine cells are prevented by melatonin. *J Pineal Res* 2008 Sep;45(2):191-8.

(36) Gil V, Gallego D, Grasa L, Martin MT, Jimenez M. Purinergic and nitregeric neuromuscular transmission mediates spontaneous neuronal activity in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010 Jul;299(1):G158-G169.

(37) Jimenez M. Hydrogen sulfide as a signaling molecule in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2010 Nov;22(11):1149-53.

(38) Szurszewski JH, Farrugia G. Carbon monoxide is an endogenous hyperpolarizing factor in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2004 Apr;16 Suppl 1:81-5.

(39) Grassi M, Petraccia L, Mennuni G, Fontana M, Scarno A, Sabetta S, et al. Changes, functional disorders, and diseases in the gastrointestinal tract of elderly. *Nutr Hosp* 2011 Jul;26(4):659-68.

(40) D'Antona G, Hennig GW, Costa M, Humphreys CM, Brookes SJ. Analysis of motor patterns in the isolated guinea-pig large intestine by spatio-temporal maps. *Neurogastroenterol Motil* 2001 Oct;13(5):483-92.

(41) Spencer NJ, Nicholas SJ, Robinson L, Kyloh M, Flack N, Brookes SJ, et al. Mechanisms underlying distension-evoked peristalsis in guinea pig distal colon: is there a role for enterochromaffin cells? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011 Sep;301(3):G519-G527.

American Journal of Gastroenterology (Sent for publication)

CHARACTERIZATION OF THE MOTOR INHIBITORY ROLE OF COLONIC MUCOSA UNDER STIMULATION

Francisco E. Martín-Cano, Pedro J. Camello and María J. Pozo*

Dept of Physiology, Faculty of Nursing and Occupational Therapy, University of
Extremadura, 10003 Cáceres, Spain

Running head: Stimulated mucosa inhibits colonic contractility

***Correspondence to:**

María J. Pozo
Department of Physiology
Faculty of Nursing and OT
Avda Universidad s/n
10003 Cáceres
Spain
Phone: ++ 34-927-257450
Fax: ++ 34-927-257451
E-mail: mjpozo@unex.es

Keywords: colon, mice, mucosa, bethanechol, nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO), hydrogen sulfide (H₂S), gasotransmitters.

CONTENTS

- 1.- Abstract
- 2.- Introduction
- 3.- Material and methods
 - 3.1.- Animals
 - 3.2.- Contraction recording of colonic smooth muscle strips
 - 3.4.- Solutions and drugs
 - 3.5.- Data analysis
- 4.- Results
 - 4.1.- Mucosa exerts inhibitory effects on myogenic and neurogenic contractions
 - 4.2.- Mucosal replacement but not mucosal extracts mimics mucosa-induced effects on FT strips
 - 4.3.- Inhibitory effects of the mucosa on stimulated contractility are mediated by mucosal neurotransmitters.
- 5.- Discussion
- 6.- Acknowledgements
- 7.- Author contributions
- 8.- Reference List

1. Abstract

The main roles of colonic mucosa are the absorption/secretion of water and electrolytes and the barrier function that preserves the integrity of the colonic wall. The mediators and mechanisms to accomplish these functions are under continuous investigation but little attention has been paid to a possible control of colonic motility that would fine tune the relationship between secretion/absorption/motion. The purpose of this study was to establish the role of mucosa in the control of induced colonic contractility. Young ICR-CD1 mice (3-5 mo-old) were studied. Isometric tension recording was used to record contractility in full thickness (FT) and mucosa free (MF) strips from proximal colon. Proximal FT strips showed lower KCl- and bethanechol-induced responses than MF strips. The impairment was not due to mechanical artefacts since the contractile response of FT strips to electrical field stimulation was around 50% lower than in MF. Inhibitory mucosal effect on FT strips was mimicked by immersion of a mucosal strip in the organ bath but not by addition of mucosal extract, suggesting gaseous molecules as mediator of this effect. Incubation of MF strips with synthase inhibitors of nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO) and hydrogen sulphide (H₂S) abolished the inhibition caused by mucosa addition, indicating that mucosal gasotransmitters are the mediators of mucosa effects. This suggest that the control of colonic motility exerted by mucosa would tune colonic transit to secretion/absorption processes.

2. Introduction

Two are the main functions of the colonic mucosa: water and electrolyte

absorption and barrier function, which is the basis of the defense against the luminal pathogens and toxins. The epithelial layer of the colon consists of a single sheet of columnar epithelial cells folded into finger-like invaginations called Lieberkühn's crypts that contain four epithelial cell lineages: enterocytes, goblet cells, endocrine cells and Paneth cells. The epithelium maintains its selective barrier function through the formation of complex protein-protein networks that mechanically link adjacent cells and seal the intercellular space (4).

One of the most important mechanisms in the control of intestinal transport of water is acetylcholine (ACh) released from cholinergic neurons (1), which stimulates secretion from the crypts and inhibits absorption across the surface cells. It has been recently demonstrated that ACh can be released from epithelial cells that contain the machinery necessary for the synthesis of ACh to the basolateral space and after interaction with M₃ muscarinic receptor ACh activates secretion (19). Epithelial-released ACh could then be considered as part of the non-neuronal cholinergic system and act as an intercellular messenger (8).

In addition to other neurotransmitters and hormones, it has become evident that small gaseous molecules, the so-called gasotransmitters, can regulate intestinal transport. Nitric oxide (NO), hydrogen sulfide (H₂S) and carbon monoxide (CO) are the gasotransmitters released by the epithelium to control ionic transport (12). These molecules act also as relaxing neurotransmitters in the enteric nervous system to induce smooth muscle relaxation (3; 14; 17). Much less is known, however,

about the physiological role of mucosa on colonic motility. It has been shown that mucosal application of short-chain fatty acids induces contraction of colonic longitudinal muscle probably via an enteric reflex involving local sensory and cholinergic nerves (18). This is in agreement with the release of non-neuronal ACh from rat colonic epithelial cells in response to luminal propionate in the presence of TTX (19). In the feline bladder, it has been described that the urothelium modulates bladder contractile function through local secretion of bioactive substances into the muscular layers adjacent to the urothelium. Thus, the strips without mucosa responded to electrical field stimulation (EFS), bethanechol, adenosine triphosphate (ATP) and KCl significantly greater than the strips with mucosa, which suggest an inhibitory role of the urothelium in the control of bladder contractility (10). This is in agreement with other study performed by the same group in guinea-pig bladder (9). Although the urothelium differs from the colonic mucosa in its absorptive properties both layers contact with smooth muscle layers whose activation propels contents. Results from our laboratory show that mucosa has an excitatory role on spontaneous phasic contractions of proximal colon (Martin-Cano FE, Camello PJ and Pozo MJ. Melatonin increases spontaneous colonic contractions and peristalsis in old mice: The role of the mucosa. *J Pineal Res*, in peer review) that is mediated by the inhibitory enteric nervous system. In the present study we examined the role of colonic mucosa on stimulated contractility of mouse proximal colon and characterized the mediators of mucosal effects on colonic smooth muscle contractility. We have demonstrated, for the first time, that colonic

mucosa inhibits agonist-induced contractility through the release of mucosal gasotransmitters.

3. Material and Methods

3.1. Animals

Male and female Swiss ICR:CD-1 mice (3–5- months -old) were used in the study and supplied by the animal housing service from the University of Extremadura. Animals were housed in light (12 hr light–12 hr dark cycle)- and temperature (20°C)-controlled rooms and had free access to food. Water access was restricted to the dark cycle. Experimental protocols including animal killing were performed following ethical guidelines of the Ethical Committee of the University of Extremadura. After anaesthesia with isoflurane, mice were killed by cervical transection and the colon was immediately removed and placed in cold Krebs-Henseleit solution (K-HS)..

3.2. Contraction recording of colonic smooth muscle strips

The whole colon was cleaned of fatty tissue, cut open longitudinally along the mesenteric border, and the proximal and distal colon was identified. Circularly orientated strips (~5 x 10 mm) of proximal colon were cut and placed vertically in a 5 ml organ bath filled with K-HS maintained at 37 °C and gassed with 95% O₂ - 5% CO₂. These strips contained all the layers of the colon (mucosa, submucosa with the submucosal plexus, circular muscle, myenteric plexus, longitudinal muscle and serosa) and we will refer them as full thickness strips (FT). In order to study the influence of the mucosa on colonic contractility, we pinned the proximal

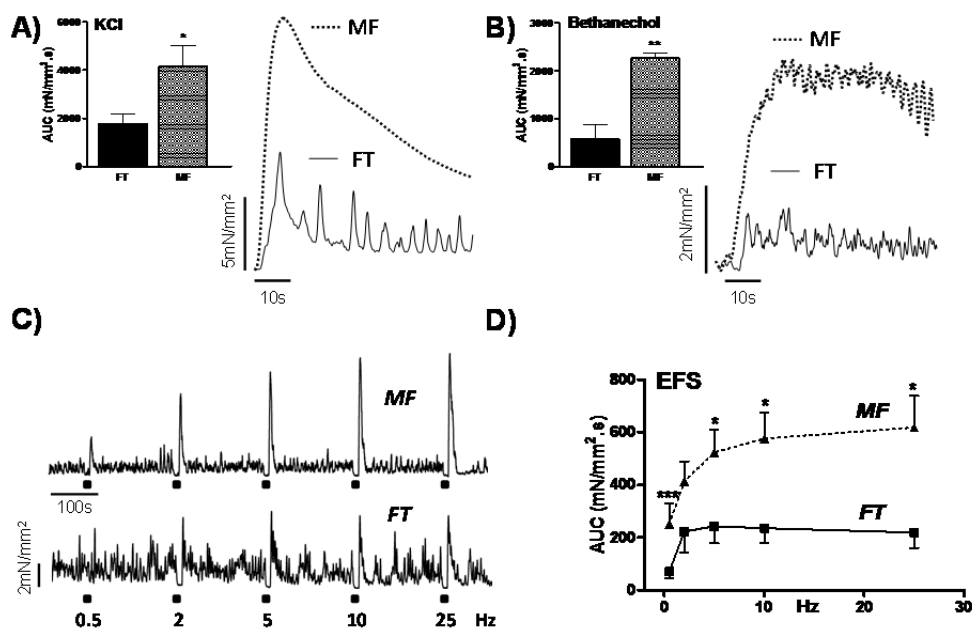


Figure 1. Mucosa decreases the miogenic and neurogenic response in the mouse colon. **A)** Representative traces of contractile responses induced by 60mMKCl in full thickness (FT) and mucosa free strips (MF). **A Inset)** Histogram showing the mean \pm SEM of the response induced by 60mM KCl in FT and MF strips. The response was measured as the area under the curve (AUC) in 60 seconds. (* $P < 0.05$ Paired Student's t-test). **B)** Representative traces of contractile responses induced by 100 μ M bethanechol in FT and MF strips. **B Inset)** Histogram showing the mean \pm SEM of the response induced by bethanechol 0.1mM in FT and MF strips. The response was measured as the AUC in 60 s. (** $P < 0.01$ Paired Student's t-test). **C)** Representative traces of complete trains of EFS stimulation applied to FT and MF strips. **D)** Category graph showing the off contractile response to electrical field stimulation (EFS) for all the frequencies tested in both types of strips. Every point represents the mean \pm SEM of the total AUC of the off contractile responses.

segments as a flat sheet, and pinched the mucosal surface with fine dissection forceps to remove carefully the mucosal layer leaving intact the underlying submucosal plexus. Throughout the results we will refer to this preparation as mucosa-free strips (MF).

Isometric contractions were measured using force displacement transducers, digitized using a MacLab hardware unit and dedicated software (ADInstruments; Colorado Spring, CO, USA). The muscle strips were mounted under an initial resting tension equivalent to 0.5 g load and allowed to equilibrate for 60 min, with solution changes every 20 min.

Strips displayed spontaneous contractility at the resting period. Strips were challenged for 5 min with a K^+ enriched K-HS (60 mM), or the muscarinic agonist bethanechol (100 μ M). In a group of FT and MF strips intrinsic nerves were activated by electrical field stimulation (EFS) with a pair of external platinum ring electrodes (0.7 mm in diameter) connected to a square wave stimulator (Cibertec CS9/3BO) programmed through Scope software application from MacLab (AD Instruments). Trains of stimuli (0.3 ms duration, 0.5-25 Hz, 350 mA current strength) were delivered for 10 s at 3 min intervals to construct a frequency response curve.

For mucosal extract preparation, the mucosal layer of the proximal colon was carefully removed and small epithelial sheets were incubated for 10 min in a 5ml Ussing chamber perfused with K-HS at 37°C and gassed with 95% O₂ - 5%. When the effects of the mucosa was assayed on myenteric strips, strips of mucosa were cut and tied with a silk thread to both ends. In one of them a small weight was fix in order to have the mucosa near by the muscle strip. At the end of each experiment the strips were dried and weighed and measured to normalize the contractile responses.

3.3. Solutions and drugs

The K-HS contained (in mM): 113 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, and 11.5 D-glucose. This solution had a final pH of 7.35 after equilibration with 95% O₂-5% CO₂.

Drug concentrations are expressed as final bath concentrations of active species. Drugs and chemicals were obtained from the following sources: aminooxacetic acid

(AOAA), bethanechol, N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), DL-propargylglycine (PPG) and suramine were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO); mesoporphirin IX chloride was from Frontier Scientific (Logan, UT) and tetrodotoxin citrate was from Tocris Cookson (Bristol,UK). Other chemicals used were of analytical grade from Panreac (Barcelona, Spain).

3.4. Data analysis

Results are expressed as means ± S.E.M. of 4-12 colonic strips from 47 animals. Colonic strip tension is given in millinewtons (mN). We normalized colonic tension data by cross sectional area (CSA (mm²) = weight (g)/specific density×length (mm), density = 1g/mm³). FT strips were weighted without the mucosa. Spontaneous contractions were measured as the area under the curve (AUC) in mN per mm² of tissue and s (mN/mm².s). A 60-s interval was selected for analysis under agonist stimuli. When the effects of EFS were

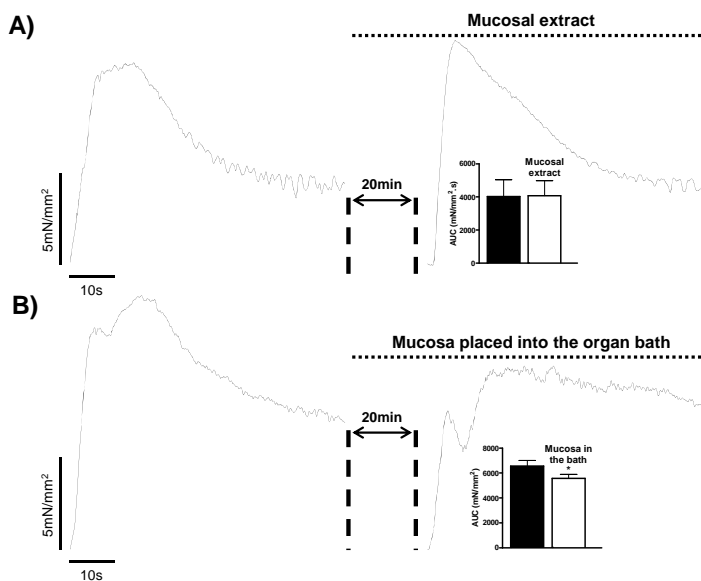


Figure 2. Reintroduction of mucosa in the organ bath reduces bethanechol-induced contractility, but mucosal extracts do not have any effects. **A)** Histogram showing the mean ± SEM of the response of MF strips to 100 μM bethanechol in the presence and in absence of mucosal extract, (n = 8). **B)** Histogram showing the mean ± SEM of the response induced by 100 μM bethanechol on MF strips in the presence and absence of previously dissected mucosa. In all cases, the response was determined as the AUC measured in 2 minutes. (*P < 0.05 Paired Student's t-test, n = 6).

quantified, we measured the AUC of the off response. The effects of the mucosa or mucosal extract are expressed as the percentage of change, taking as 100% the AUC of the 60-s period of agonist challenge in control conditions.

Statistical differences between multiple groups were tested using either one or two way analysis of variance for repeated measures (ANOVA) followed by planned comparisons t-test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

4. Results

4.1. Mucosa exerts inhibitory effects on myogenic and neurogenic contractions

KCl-induced depolarization (60 mM) causes a contractile response of lower magnitude in FT than in MF strips (58 % of inhibition, $P < 0.05$, Fig. 1A). Similarly, the

muscarinic agonist bethanechol (100 μM) evoked an increase in isometric tension that was significantly reduced in FT compared to MF strips (74.7 % of inhibition, $P < 0.01$, Fig. 1B). It could be argued that this result was due to a barrier effect of the mucosa if this layer, although very thin in mice, diminished the diffusion of exogenous agonists into the muscularis tunica and as result would reduce myogenic contractility. To rule out this possibility, we performed EFS to stimulate enteric nervous system and induce neurotransmitter release within the smooth muscle layers. As it is characteristic in the colon, EFS, at frequencies higher than 0.5 Hz, induced a relaxing response that decreased the basal tension and abolished spontaneous phasic contractions. This relaxing response lasted the 10 s-period of stimulation ("on" relaxation) and was followed by a rebound contraction ("off"

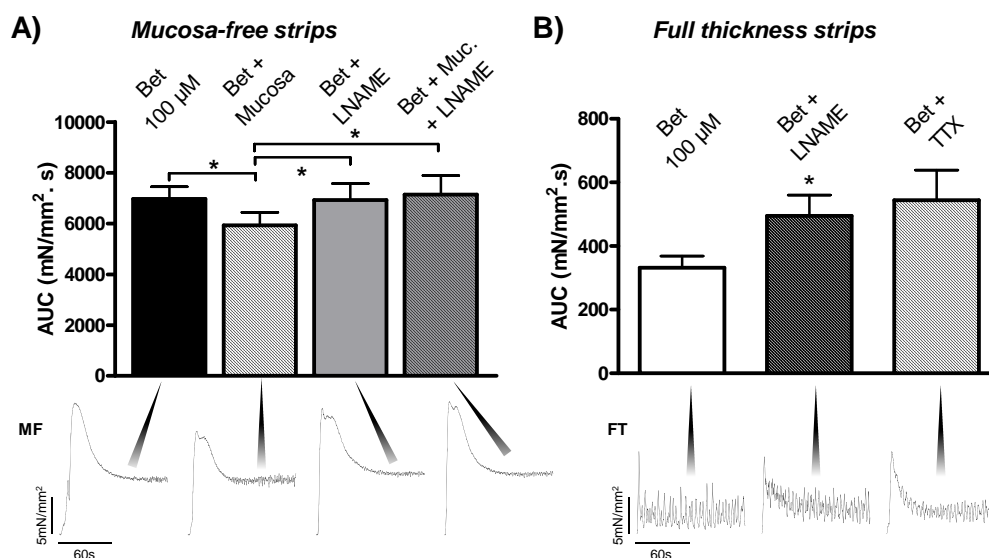


Figure 3: Nitric oxide plays a key role in the mucosal influence over colonic contractility. **A)** Mucosa-induced inhibition caused by addition of the mucosa to the organ bath is reverted by pretreatment with L-NAME. Histogram showing the response of MF strips to Bethanechol 100 μM in the presence and in absence of mucosa into the organ bath in control conditions and under non nitroergic conditions (L-NAME 100 μM). (* $P < 0.05$ Bonferroni multiple comparison post test repeated measures ANOVA) (n: 5). **B)** L-NAME Increases bethanechol response in full thickness strips. Histogram showing the response of full thickness strips to bethanechol 100 μM in the presence and in absence of L-NAME 100 μM and TTX 0.5mM. (* $P < 0.05$ Paired Student's t-test) (n: 6-8).

contraction) with a frequency-dependent amplitude in MF strips but not in FT strips (Fig. 1C). It is very remarkable the strong inhibition induced by mucosa on EFS-induced off contractions (59 and 65 % of inhibition at 10 and 20 Hz, respectively. $P < 0.05$, Fig. 1D). Note that this is a specific effect of the mucosa on stimulated contractility (EFS-induced response) whereas, in agreement with previous results from our group (Martín-Cano FE, Camello PJ and Pozo MJ. Melatonin increases spontaneous colonic contractions and peristalsis in old mice: The role of the mucosa. *J Pineal Res*. In peer review.), mucosa enhances spontaneous contractility (Fig. 1C, inter-EFS periods).

4.2. Mucosal replacement but not mucosal extracts mimics mucosa-induced effects on FT strips

To characterize the origin of the inhibitory effects of the mucosa, KCl was undesirable because it cannot be added to the organ bath directly but as substitution of KCl-enriched K-HS by the K-HS of the organ bath, what induces recording artefacts. The use of neurogenic contractions (EFS) as stimulus has also drawbacks because it would give confounding results when blockers of neurotransmitters were used, as it would not be possible to distinguish whether the effects came from mucosal or neural inhibition. Therefore, we used bethanechol to test the effects of mucosal extracts (K-HS containing mucosal diffusible factors –see Methods section-). We challenged MF strips with bethanechol, and after washing for at least 20 min, mucosal extract was substituted by K-HS and the strip was immediately stimulated with bethanechol. As observed in Fig. 2A, mucosal extracts did not have any

significant effect on bethanechol-induced contraction. However, when the second bethanechol stimulus was applied in the presence of a mucosa strip nearby the muscle strip, a significant reduction in the AUC was observed (15 %, $P < 0.05$).

4.3. Inhibitory effects of the mucosa on stimulated contractility are mediated by mucosal gasotransmitters.

Above experimental data suggest that the inhibitory effects of mucosa are due to gaseous or short-lived molecules. Since the epithelial cells of the mucosa synthesize NO (6; 16) we performed organ bath studies to demonstrate that NO was involved in the inhibitory effects of mucosa. After testing bethanechol-induced contractility in MF strips in control conditions, we repeated the stimulus in the presence of a mucosal strip, what significantly reduced the response to bethanechol (15%, $P < 0.05$, Fig. 3A). When bethanechol was assayed in the presence on L-NAME, no differences were found respect to control conditions. Finally, L-NAME was able to abrogate mucosa-induced impairment of bethanechol response. In a different set of experiments FT strips were stimulated in the absence and presence of L-NAME (Fig. 3B). The treatment with the nitric oxide synthase blocker enhanced bethanechol-induced contractile response (50%, $P < 0.05$). Similarly, after pre-treatment with TTX, a neuronal Na^+ channel blocker, there was an increase, although not statistically significant, of the bethanechol response in FT strips.

To confirm that the release of NO would decrease bethanechol contractility in MF strips, after testing the response to bethanechol in control conditions, the NO donor sodium nitroprusiate (100 μM) was

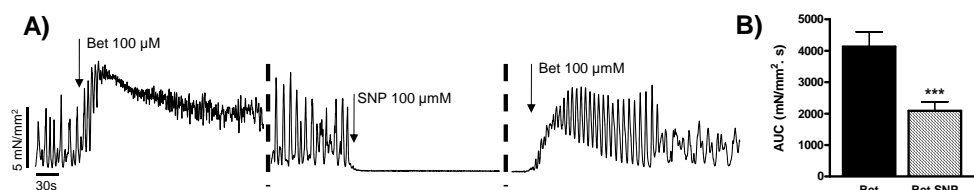


Figure 4. Nitric oxide donor sodium nitroprusside (SNP) decreases the response to bethanechol. **A)** Original isometric contraction register from circular-orientated mucosa free strips showing the contractile response to bethanechol 100 μ M in presence and absence of SNP 100 μ M. **B)** Histogram showing the response of mucosa free strips to bethanechol 100 μ M in the presence and in absence of SNP 100 μ M ($P < 0.001$ Paired Student's *t*-test) (n: 7).

added to the organ bath and then bethanechol was assayed (Fig. 4A). As shown in Fig. 4B, exogenous NO reduces significantly spontaneous phasic contractions and bethanechol-induced contractility (49 % of reduction, $P < 0.001$). Since NO is not the only short-lived molecule described in epithelial cells, we assayed the effects of blockers of H₂S and CO synthesis. In addition we tested the effects of suramine, a blocker of the non-gaseous inhibitory neurotransmitter ATP as a negative control. The protocol used was the same as the one used to check the effects of L-NAME: a first challenge with bethanechol in control conditions and a second challenge in the presence of both the mucosal strip and the blocker of election or just mucosa in the control group. As represented in Fig. 5, colonic mucosa decreased significantly the response to bethanechol, but not when blockers of H₂S-producing enzymes cystathionine γ -lyase (CSE) (AOAA, 500 μ M) and cystathionine β -synthase (CBS) (PPG, 1 mM) were present. This is also the case for MPF X (5 μ M), a blocker of HO-2, the constitutive isoform of haemoxygenase (HO), or when blockers for all the gasotransmitters were used (all volatile group). However, the blockade of ATP neurotransmission by suramine (100 μ M) did not reduce the inhibitory effects of mucosa ($P < 0.05$).

5. Discussion

In the present study, we have demonstrated for the first time that mucosal layer plays an inhibitory role on colonic motility induced by depolarization, the muscarinic agonist bethanechol and a physiological stimulus that is the activation of the enteric nervous system by EFS. Inhibitory gaseous molecules released by the epithelial layers such as NO, H₂S and CO mediate this inhibition.

The possibility that this inhibition were due to a mechanical effect of mucosa that would act as a barrier for the agonists used in the study should be ruled out as demonstrates the inhibition of EFS-induced contractility exerted by the mucosa. Out of the three stimuli used to induce contraction, activation of enteric nerves is the most physiological one, since neurotransmitters are released from motor nerve varicosities to the "neuro-effector" junction where interstitial cells of Cajal (ICCs), enteric neurons, glial cells and smooth muscle cells, amongst other cells interact to induce contraction (13). The fact that FT strips contract in response to EFS less than 50% compared to MF strips, clearly points out that this is a physiological role of mucosa.

The negative influence of mucosa on colonic motility can only be explained by mucosa-induced release of inhibitory or relaxing substances. The lack of effects of the

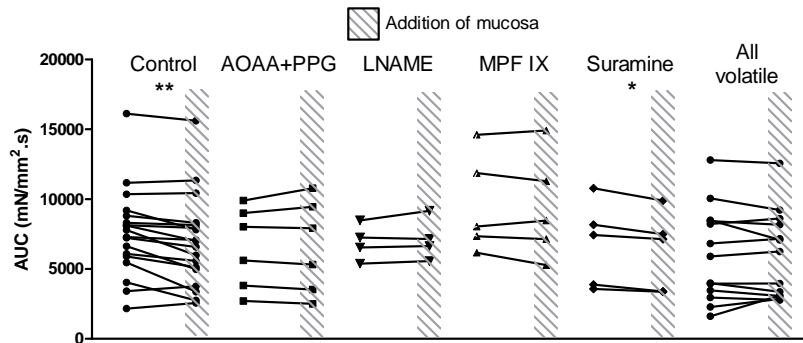


Figure 5. Volatile neurotransmitters such as H₂S, NO and CO may play a role on the mucosa-induced decrease of bethanechol response. Addition of mucosa to the organ bath decreases the response to bethanechol 100 μ M (control). This decrease is reverted by blocking the synthesis of H₂S (AOAA & PPG, 500 μ M and 1mM, respectively), NO (L-NAME 100 μ M) or CO (MPF IX 5 μ M), while blockade of ATP (suramine 100 μ M) does not change mucosal effect. (*P < 0.05/**P < 0.01 paired Student's t-test. n:4-6)

mucosal extracts and the reduction of motility evoked by the addition of a mucosa strip nearby de MF strip indicates that gaseous molecules should be the mediators. NO, H₂S and CO have been described as gaseous neurotransmitters in the enteric nervous system and also play a role in the response to gastrointestinal injury (3; 7; 11). Our result with specific inhibitors of their synthetic enzymes clearly demonstrates that the three of them are involved in the effects of the mucosa. There is evidence for the expression of the key enzymes for NO, H₂S and CO formation in colonic epithelial cells (5; 6; 15; 16). Activation of their epithelial release when mucosa is under stimulation would explain the release from the mucosa once it has lost its connections with the submucosal and myenteric plexus (in our experimental conditions). However, the inhibitory effect of the mucosa in FT strips is higher than the effect of addition of the mucosa to MF strips (compare Fig 1 and Fig 3A), which could be due to damage of the mucosa as consequence of experimental manipulations or to the interruption of nerve connections between mucosa and enteric plexuses. It could be plausible that both mucosal and enteric nerve-induced release

coexist, similar to the control of mucosal secretion by ACh of both neural and non-neural origin (2; 19).

In keeping with the motor regulatory role of mucosa described herein, a previous study from our group has shown an excitatory effect of the mucosa on spontaneous phasic contractions (Martín-Cano FE, Camello PJ and Pozo MJ. Melatonin increases spontaneous colonic contractions and peristalsis in old mice: The role of the mucosa. *J Pineal Res.* In peer review). In fact, herein both effects of mucosa controlling colonic motility can be observed in Fig. 1C. Undoubtedly the opposite mucosal effects on motility raise more questions than this research solves. Non least among these is the physiological relevance of the dual role of mucosa depending on its status of activation. The answer could be that mucosal-induced changes in motility are aimed to accomplish the passage of colonic content through the colon. When colonic content moves through the colon, short-chain fatty acid acids will be released and would induce an increase in non-neural ACh that promotes mucosal secretion (18) and similar to what we have observed in this report, mucosa will inhibit

colonic motor patters to delay colonic transit and favour secretion. In the interdigestive period, the prokinetic effect of mucosa would supply the lack of stimuli in the mucosa to promote colonic propulsory patterns. This is a new paradigm for mucosal control of colonic motility.

In conclusion, our results indicate that mucosa when stimulated would inhibit myogenic and/or neurogenic smooth muscle contraction as the result of gasotransmitters release (NO, CO and H₂S). More studies are needed to get clearer insights into this proposed mucosal motor control.

6. Acknowledgements

We thank the technical support of P. Delgado y F. Barriga. Supported by BFU2007- 60563, BFU2011-24365, RETICEF RD12/0043/0016, FEDER and Junta de Extremadura (GR10009).

7. Author contributions

María J Pozo and Pedro J Camello performed the study design. Francisco E. Martin-Cano and María J. Pozo carried out data collection. Francisco E. Martin-Cano analyzed data. Francisco E. Martin-Cano and Pedro J Camello performed statistical analysis and data interpretation.

María J Pozo and Pedro J Camello and Francisco E. Martin-Canowere involved in manuscript

Preparation. Each author has seen and approved the submitted manuscript.

8. Reference List

- (1) Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2009 Jul;124(1):3-20.
- (2) Cameron HL, Perdue MH. Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol Motil* 2007 Jan;19(1):47-56.
- (3) Yajima T, Inoue R, Matsumoto M, Yajima M. Non-neuronal release of ACh plays a key role in secretory response to luminal propionate in rat colon. *J Physiol* 2011 Feb 15;589(Pt 4):953-62.
- (4) Klapproth H, Reinheimer T, Metzén J, Munch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, et al. Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997 Apr;355(4):515-23.
- (5) Pouokam E, Steidle J, Diener M. Regulation of colonic ion transport by gasotransmitters. *Biol Pharm Bull* 2011;34(6):789-93.
- (6) Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* 2012 Apr;92(2):791-896.
- (7) Gibbons SJ, Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2004 Apr 15;556(Pt 2):325-36.
- (8) Sanders KM, Ward SM, Thornbury KD, Dalziel HH, Westfall DP, Carl A. Nitric oxide as a non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter in the gastrointestinal tract. *Jpn J Pharmacol* 1992;58 Suppl 2:220P-5P.
- (9) Yajima T. Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *J Physiol* 1985 Nov;368:667-78.
- (10) Levin RM, Wein AJ, Krasnopolsky L, Atta MA, Ghoniem GM. Effect of mucosal removal on the response of the feline

bladder to pharmacological stimulation. *J Urol* 1995 Apr;153(4):1291-4.

(11) Krasnopolsky L, Levin RM, Longhurst PA. The role of the mucosa in the in vitro changes in guinea pig bladder function which occur after sensitization with ovalbumin. *Pharmacology* 1995 Feb;50(2):119-27.

(12) Martín-Cano FE, Camello PJ, Pozo MJ. Melatonin increases spontaneous colonic contractions and peristalsis in old mice: The role of the mucosa. *J Pineal Res* 2013; Under review.

(13) Hennig B, Schultheiss G, Kunzelmann K, Diener M. Ca²⁺-induced Cl⁻ efflux at rat distal colonic epithelium. *J Membr Biol* 2008 Jan;221(2):61-72.

(14) Torihashi S, Horowitz B, Pollock JS, Ward SM, Xue C, Kobayashi S, et al. Expression of nitric oxide synthase in mucosal cells of the canine colon. *Histochem Cell Biol* 1996 Jan;105(1):33-41.

(15) Sanders KM, Hwang SJ, Ward SM. Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs. *J Physiol* 2010 Dec 1;588(Pt 23):4621-39.

(16) Lundberg JO, Weitzberg E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. *Gut* 2013 Apr;62(4):616-29.

(17) Jimenez M. Hydrogen sulfide as a signaling molecule in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2010 Nov;22(11):1149-53.

(18) Steidle J, Diener M. Effects of carbon monoxide on ion transport across rat distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011 Feb;300(2):G207-G216.

(19) Hennig B, Diener M. Actions of hydrogen sulphide on ion transport across rat distal colon. *Br J Pharmacol* 2009 Nov;158(5):1263-75.

(20) Diener M, Knobloch SF, Bridges RJ, Keilmann T, Rummel W. Cholinergic-mediated secretion in the rat colon: neuronal and epithelial muscarinic responses. *Eur J Pharmacol* 1989 Sep 13;168(2):219-29.

Neurogastroenterology and motility (Sent for publication)

AGING IN THE MOUSE COLON. IMPORTANCE OF THE NEURAL INFLUENCE FROM SUBMUCOSAL PLEXUS.

Martín-Cano, FE¹; Gómez-Pinilla, PJ²; Barriga, LF¹; Camello, PJ¹; Pozo, MJ¹.

¹ Department of Physiology. Faculty of Nursing and Occupational Therapy. University of Extremadura. 10003. Cáceres, Spain.

² Translational Research in GastroIntestinal Disorders. O&N I Herestraat 49 - box 701. 3000 Leuven.

Running title: Age-related changes in mouse colon

Correspondence to:

María J. Pozo
Department of Physiology
Faculty of Nursing and OT
Avda Universidad s/n
10003 Cáceres
Spain
Phone: ++ 34-927-257450
Fax: ++ 34-927-257451
E-mail: mjpozo@unex.es

Keywords: : Aging, colonic contractility, submucous plexus, neurotransmission.

CONTENTS

- 1.- Abstract
- 2.- Introduction
- 3.- Material and methods
 - 3.1.- Animals
 - 3.2.- Tissue preparation
 - 3.3.- Immunohistochemistry
 - 3.4.- Contraction recording of colonic smooth muscle strips
 - 3.5.- Cell isolation
 - 3.6. Cell loading and $[Ca^{2+}]_i$ determination
 - 3.7. Solutions and drugs.
 - 3.8. Quantification and statistics.
- 4.- Results
 - 4.1.- Spontaneous contractile activity of murine colon
 - 4.2.- Myogenic contractile response of murine colon
 - 4.3.- EFS-induced contractile response of murine proximal colon
 - 4.4. EFS-induced contractile response of murine distal colon
- 5.- Discussion
- 6.- Acknowledgements
- 7.- Disclosure
- 8.- References

1. Abstract

Background: Aging in the gastrointestinal tract affects virtually all its components. Losses of neurons, ICCs or glial cells induced by oxidative stress or mitochondrial dysfunction have been proposed as mechanism of aging. There is a lack of papers devoted to study the functional consequences of aging in colon. In this study, we investigate the impact of aging in spontaneous and induced contractile responses, as well as the influence of the submucosal plexus.

Methods: 3 and 22 month old mice were used in the study. Colonic contractility was assessed by isometric tension recordings from circular-orientated strips with and without submucosal plexus.

Results: Although spontaneous phasic contractions (SPCs) of myenteric (MY) strips are the same in adult and aged animals, the submucosal plexus (SmP) exerts an age-related inhibitory effect on SFCs due to an increase in the nitrenergic component. In contrast, myogenic contractility evaluated by bethanechol was not affected by the presence of SmP, but decreased by aging. Neurogenic contractility of proximal colon showed a dependence of age in MY strips and the SMP exerted inhibitory actions in adult strips through nitrenergic neurons, that compensated the reduction of the response in aged MY strips. In the distal colon SMP induced an increase in neurogenic contractility of aged strips, as consequence of the increase in adrenergic and cholinergic contributions.

Conclusions & inferences: Mouse colonic motility is mainly preserved in the elderly. The presence of compensatory mechanism of submucosal origin contribute

to maintain the essential motor function of the colon in old mice.

2. Introduction

Global demographics are changing dramatically in the last decades. According to the United Kingdom Office of National Statistics, the average life expectancy is now 78 years for males and 82 years for females and the percentage of persons aged over 75 years has increased by 8% from 2000 to 2009. Furthermore, it is anticipated that, by 2050, the size of the population aged over 65 years will double in size, whereas US Bureau of the Census has predicted that the size of the US population 85 years of age or older will increase from around 5 to 20 million in the period of 2000 to 2050 (1). These data reinforce the need of investigate in aging in order to increase the quality of life in the elderly and to reduce health care costs related to age-related diseases in this segment of population.

The process of aging involves complex physiological changes that are not fully understood. Overall, the gastrointestinal tract ages well, and function of the gastrointestinal tract is relatively well preserved with increasing age (2;3). In agreement with this, it has been described that aging does not affect the prevalence of gastrointestinal disorders such as abdominal pain, irritable bowel syndrome and chronic diarrhea (4;5). However, since neurodegeneration has been described in aged gut (3;6) and neuromuscular function is of great importance in colonic motor patterns, alterations of colonic motility is possible to occur in aging. Mechanisms underlying aging of the gastrointestinal tract include loss of intrinsic and extrinsic neurons, enteric glia and Interstitial Cells of

Cajal (ICC) together with a diminished contractility of gut smooth muscle (7;8). Suggested mechanisms for cellular loss include oxidative stress and mitochondrial dysfunction (7) since caloric restriction (9-11) and supplementation with specific nutrients, for example, omega-3 fatty acids, (12) can attenuate the effects of aging in rodent models. In addition to oxidative stress we have reported that aging of gastrointestinal smooth muscle is associated to an increase in NF- κ B and COX-2 and the subsequent inflammation (13;14). Using a guinea pig model of aging, we found that aging affects innervation of gallbladder and impairs contractile response as the result of alterations in both calcium-dependent contraction and calcium sensitization pathways (14;15).

Besides morphological studies in colon, studies aiming to investigate the effect of aging on colonic function are scanty and there is not insight that could explain the higher incidence of constipation in the elderly. In fact, there is not any study reporting the effects of aging on spontaneous phasic contractions (SPCs), despite the fact that enteric plexus modulation of this activity is underlying essential motor patterns such as colonic migrating complexes and peristalsis (16). That far, attempts to identify changes in the neuromuscular function are also very scarce (17;18) and information about changes in motility due to age-related alterations of the submucosal plexus is lacking.

Our goal was to investigate the impact of aging on spontaneous, myogenic and neurogenic colonic contractions. In addition, we explore the effects of the presence of submucous plexus in colon contractility. Here we demonstrate that

myogenic response is slightly impaired by aging and that the effects of age on both SPCs and neurogenic contractility are region-dependent being the proximal colon more susceptible to aging. In addition, this study reveals that submucosal plexus controls colonic contractility and underlies some age-related changes in colonic motility.

3. Material and Methods

3.1. Animals

Data shown in this paper came from samples taken from a total number of 91 ICR-1 (Swiss) mice (35 males and 56 females). 40 animals grew older until 20-22 months and were used as the aged group. The rest 51 mice were killed at 3 months of age and used as adult controls. All animals were supplied by the animal housing service from the University of Extremadura.

3.2. Tissue preparation.

According to the Ethics Committee of the University of Extremadura, mice were euthanized by cervical dislocation after anesthesia with isoflurane (Esteve Laboratories, Barcelona, Spain). Whole colon was removed from the mouse and pinned to the base of a dissecting dish coated with Sylgard elastomer filled with ice-cold Krebs-Henseleit (K-H) solution (for composition, see Solutions and drugs). Using high precision forceps, scissors and small inoxidable metallic pins, colon was placed with the mesenteric border upwards and opened longitudinally following this structure. Once opened and pinned flat with the mucosa facing up, fecal content was flushed out using a disposable Pasteur pipette and the colon was then divided into proximal, medial and distal segments. The

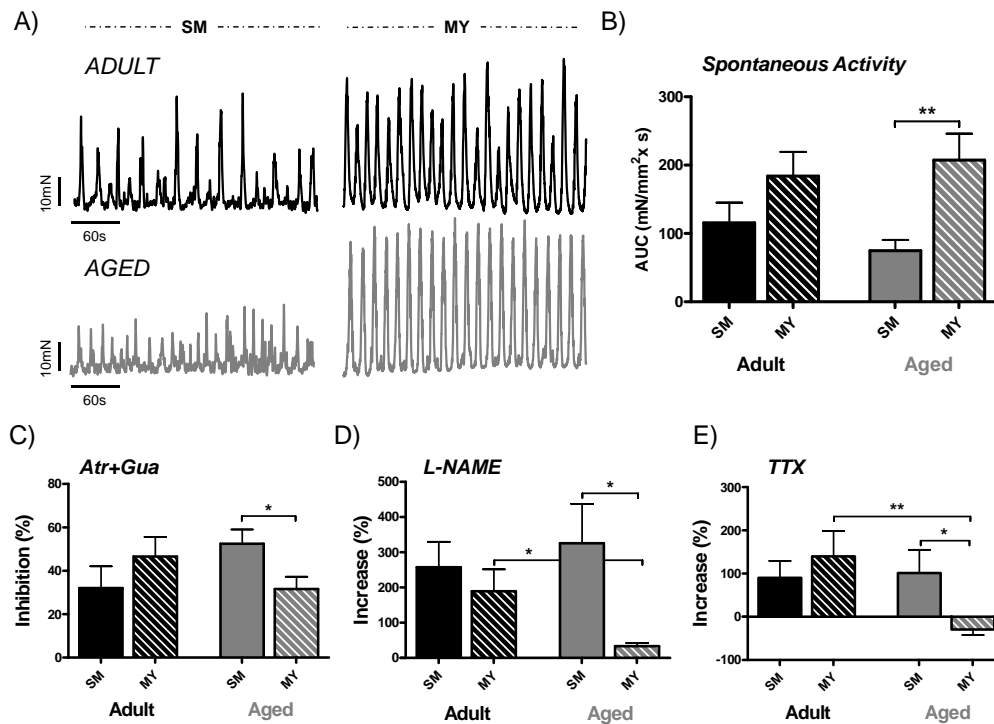


Figure 1. Submucosal plexus influence over proximal colonic spontaneous activity is higher in aged animals. **A)** Representative traces from aged and adult animals showing typical spontaneous activity patterns of strips with both nervous plexus (SM) and just with myenteric plexus (MY). **B)** Histogram representing mean \pm SEM of the AUC of basal spontaneous activity measured in 5 minutes in both types of strips and both experimental groups. (** $p < 0.01$ Unpaired Student's t-test Aged SM vs. Aged Aged MY. $n = 6-9$ strips from 6-9 animals). **C, D, E)** Histograms showing the effect of $10\mu\text{M}$ Atropine + $10\mu\text{M}$ Guanetidine, L-NAME 0.1mM and TTX $5\mu\text{M}$ in the AUC of the spontaneous activity. The percentage of change is referred to the period immediately before adding the drug, except for the TTX, which is referred to the basal period. (* $p < 0.05$ // ** $p < 0.01$ Unpaired Student's t-test. Comparisons indicated by upper bars. $n = 6-9$ strips from 6-9 animals).

medial part was used in experimental procedures outside of the porpoise of this work.

3.3 Contraction recording of colonic smooth muscle strips.

The proximal and distal colon segments were cut following the orientation of the circular muscle in strips of about 3 by 10mm that were dissected removing either mucosa and submucosa or just the mucosal layer. Thus, the resultant types of strips were

as follows: Submucosal strips (SM), containing both plexus (Submucosal plexus –SmP and myenteric plexus –MyP), and myenteric strips (MY), which only had the myenteric plexus (MyP). After dissection, strips were attached to a holder with 5/0 silk thread and placed vertically in a 5-ml organ bath (Panlab, Barcelona, Spain) filled with K-H solution maintained at 37°C and gassed with 95% O_2 -5% CO_2 . Isometric contractions were measured using force displacement transducers that were

interfaced with a computer by a PowerLab 8/30 hardware unit and software (AD Instruments, Colorado Springs, CO). Muscle strips were placed under an initial resting tension equivalent to 0.5g in order to set the muscle at optimum length. Electrical field stimulation (EFS) was applied by a pair of electrodes placed in the strips holders and connected to a stimulation unit (Cibertec CS 220, Madrid, Spain). The stimulation protocol consists in trains of square pulses of 300 mA and 0.3ms at frequencies of 0.5, 2 and 10Hz. The duration of the trains was 10s and the interval between them 180s.

3.4. Solutions and drugs.

The Krebs-Henseleit solution contained (in mM) 113 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, and 11.5 D-glucose. This solution had a final pH of 7.35 after equilibration with 95% O₂-5% CO₂. Drugs and chemicals were obtained from the following sources: Bethanechol, atropine sulphate, guanetidide and L-NAME from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Other chemicals used were of analytical grade from Panreac (Barcelona, Spain). The drugs dissolved in DMSO were diluted such that the final concentration of DMSO was under 0.1% (vol vol⁻¹). This concentration of DMSO did not have any effect on colonic muscle tone.

3.5. Quantification and statistics.

Results are expressed of n colonic strips from n animals. Colonic muscle tension is given in millinewtons per milligram of tissue. Statistical differences between means were determined by Student's t-test. The contribution of submucosal plexus was determined by regular two way ANOVA plus Bonferroni post test and the effects of the inhibitors

used were analyzed by repeated measures 2-way ANOVA and Bonferroni post test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

4. Results

4.1 Age-induced changes on spontaneous contractile activity

In mouse proximal colon strips devoid of mucosa, spontaneous contractile activity appeared approximately after 20 minutes in the organ bath. Given that distal colon strips did not show spontaneous activity in a consistent manner, we decided to use exclusively the proximal colon to study this phenomenon. In adult mice, spontaneous contractile activity was found in all strips from both SN and MY preparations. In the same line, 12 out of 15 strips from aged mice exhibited spontaneous contractile activity in both types of preparations, indicative that aging does not have a severe impact in the establishment of spontaneous contractile activity in the proximal colon.

Colonic Spontaneous Activity				
Amplitude	Adult Both	Aged Both	Adult MYP	Aged MYP
Mean	24.65	15.25 ^a	35.8	32.9
St. Error	6.62	2.68	5.6	6.72
Frequency	Adult Both	Aged Both	Adult MYP	Aged MYP
Mean	4.44	5.26	4.31	5.23
St. Error	0.45	0.69	1.21	0.67

Table 1. Amplitude (mN/mm²) and frequency (Events/min) values of the spontaneous activity showed in proximal colon strips from both experimental groups. (**a** $p < 0.05$ unpaired student's t test Aged Both vs Aged MyP)

Since adult and aged strips developed SPCs, we then explored the possible effect of aging and the presence of SmP on the frequency and amplitude of this activity. Regarding frequency, no changes were observed when comparing adult and aged

animals for any of the preparations. The same happened with the comparison between SM and MY strips within each age group, suggesting that neither submucosal plexus nor age affect the frequency of the spontaneous activity. The amplitude of this phasic activity did not differ between age groups either. However, the presence of submucosal plexus reduced the amplitude of SPCs in both groups. Specifically, in the adult group SM strips had a 31.5% lower amplitude than MY, while SM strips from aged animals exhibits a decrease of about 52.5% compared with MY strips ($P < 0.05$). All the values describing frequency and amplitude of the spontaneous activity are summarized in table 1.

To further analyze the colonic spontaneous activity we calculated the area

under the curve (AUC) for a period of 5 minutes. This parameter combines frequency and amplitude and allows us to compare more accurately the SPCs between age groups, preparations and treatments. We found that the spontaneous contractile activity in SM strips is slightly lower in aged animals, although statistically non significant (Fig. 1A and 1B; $p = 0.15$, unpaired Student's *t* test). In fact, 6 out of 8 strips from aged animals showed lower AUC than the mean from adult animals. Removal of SmP had not significant impact on the AUC in strips from adult mice but increased SPCs in old mice (Fig. 1A and 1B; $p < 0.05$ unpaired Student's *t* test). The results from aged animals point out possible changes in SmP or MyP associated to age. Therefore, we checked the effects of

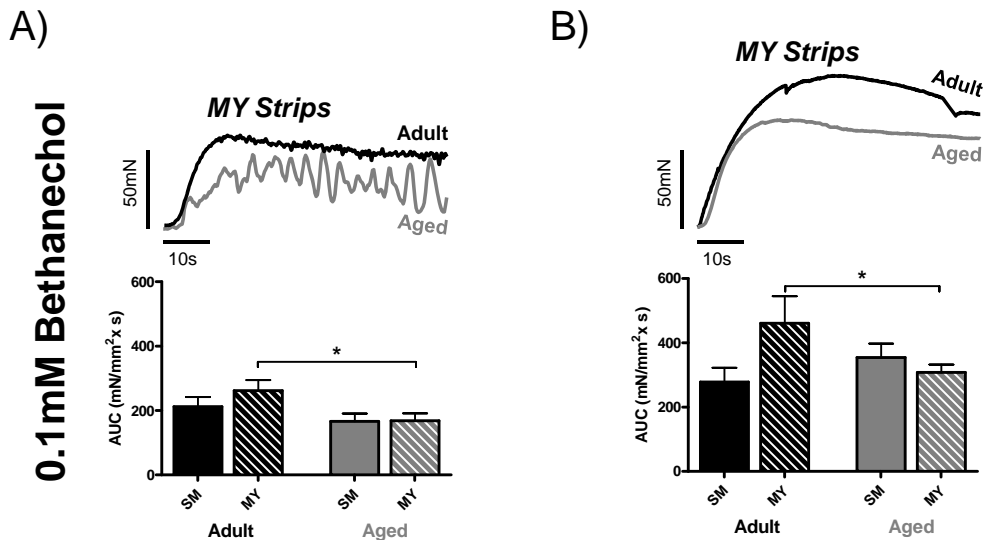


Figure 2. Aging decreases miogenic contraction in the colon. Each panel of the figure (A, B) contents representative traces (Above) and histogram showing mean \pm SEM of the AUC of the miogenic response to bethanechol 0.1mM in proximal (A) and distal colon (B) for both experimental groups. **A)** Bethanechol 0.1mM. Proximal colon ($*p < 0.05$ Unpaired *t* student Adult MY vs. Aged MY). **B)** Bethanechol 0.1mM Distal colon ($*p < 0.05$ Unpaired *t* student Adult MY vs. Aged MY). (n=9-16 strips from 9-16 animals)

different neurotransmitter inhibitors to determine the origin of these changes. In non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) conditions (1 μ M atropine plus 100 μ M guanethidine) there was a reduction on SPCs that was similar in both adult and aged animals. The presence of SmP did not have effects in adults but increased the relevance of NANC innervation in aged animals (Fig. 1C, $P < 0.05$ unpaired Student's t test).

We then treated the strips with 0.1 mM L-NAME and found an increase on SPCs in SM strips that was similar in adult and aged animals, indicating no effects of age in the function of the total pool of nitrenergic neurons in the enteric plexus (Fig 1D, $p = 0.6$). When nitrenergic contribution was dissected in MY strips, there was a statistically significant inhibitory effect of age and consistently L-NAME only induced a subtle increase in phasic contractions of aged strips (Fig. 1D, Adult MY vs. Aged MY: $p < 0.05$ unpaired Student's t test) / . It is very remarkable that the presence of SmP recovered the nitrenergic contribution in aged strips (Fig 1D, Aged SM vs. Aged MY: $p < 0.05$ unpaired Student's t test), which suggests an age-related increase in the nitrenergic component of SmP. Similar to L-NAME, the treatment with 0.1 μ M of tetrodotoxin increased colonic SPCs with the exception of aged MY strips, which displayed lower activity in the presence of the Na⁺ channel blocker.

4.2. Age-induced changes on myogenic contractile response

In order to check the contractile status of the colonic smooth muscle, colonic strips were challenged with the muscarinic agonist bethanechol (0.1 mM). The physiology and motility patterns of the colon

vary according the considered region, and therefore we analyzed the effects of aging on both the proximal and distal colon. Unlike the spontaneous activity, bethanechol-induced contractile responses in both regions, assessed as amplitude (Table 2) or AUC (Fig. 2), were not significantly affected by the presence of the SMP.

The analysis of the AUC and amplitude of the responses in both segments (Fig. 2 and Table 2) showed lower responses in the aged group compared with adults (* $p < 0.05$ unpaired Student's t test Adult MY vs. Aged MY).

4.3. Age-induced changes on neurogenic contractile responses

Bethanechol Response Amplitude					
	Adult SM	Aged SM	Adult MY	Aged MY	
Prox.	Mean	56.65	46.71 ^{xxx}	82.61 ^{xy}	49.38 ^z
	Std. Error	6.88	7.07	12.83	4.41
Distal	Mean	63.36 ^d	85.31	101.3 ^{ee}	67.92
	Std. Error	8.46	9.38	20.44	50.20

Table 1. Amplitude (mN/mm²) and frequency (Events/min) values of the spontaneous activity showed in proximal colon strips from both experimental groups. (a $p < 0.05$ unpaired student's t test Aged Both vs Aged MyP)

Neuromuscular colonic function was tested using electrical field stimulation (EFS). We found that EFS evoked an "on"-relaxation (during the 10 seconds of electrical stimulation) followed by an "off"-contraction (after the 10 seconds of stimulation). "On"-relaxations did not follow any frequency dependency trend under our experimental conditions and very often were masked by the SPCs, making its analysis extremely difficult to perform. However, "off"-contractions were more evident and allowed a reliable analysis for the SM and MY preparations from adult and

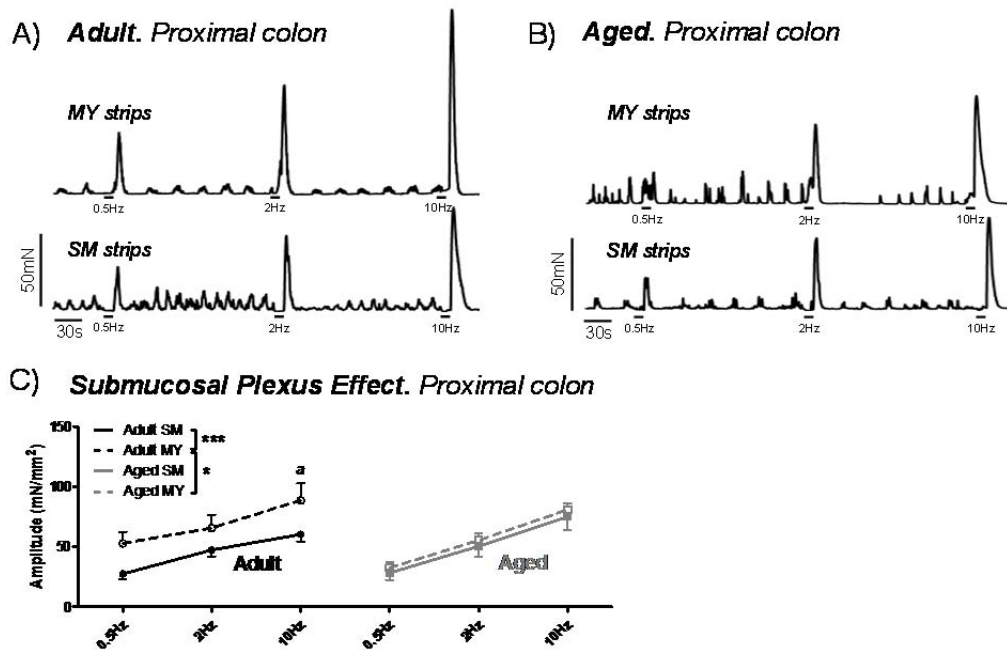


Figure 3. In proximal colon, submucosal plexus decreases the amplitude of the EFS off-response in adult animals. This inhibitory influence disappears in the aged mice. **A)** Representative traces from adult animals showing the differential response of SM and MY strips to EFS (0.5, 2 & 10Hz). **B)** Representative traces from aged animals showing similar responses of SM and MY strips to EFS (0.5, 2 & 10Hz). **C)** Trend graph displaying the mean \pm SEM of the amplitude of the off-response to EFS in SM (solid lines) and MY strips (dashed lines) in both experimental groups. (***) $p < 0.001$ Two way ANOVA Adult SM vs. Adult MY // **a** $p < 0.01$. Bonferroni posttest Two way ANOVA Adult SM vs. Adult MY // * $p < 0.05$ Two way ANOVA Adult MY vs. Aged MY. (n=10-19 strips from 10-19 animals)

aged mice. In both groups, EFS induced representative trace is shown in Fig. 3A) with a maximal amplitude at the frequency of 10 Hz.

In the proximal colon, the SmP had an inhibitory influence in adult but not in aged strips as indicated by the comparison between MY and SM strips within each group (Fig 3, *** $p < 0.001$ Two way ANOVA Adult SM vs. Adult MY; Aged SM vs. Aged MY: ns). EFS-induced responses in SM strips did not show any significant age-related effects. However,

MY strips from aged animals showed a significant reduction in EFS-induced contractions compared to adult strips (* $p < 0.05$ Two way ANOVA Adult MY vs. Aged MY).

In order to elucidate whether the main neurotransmitters (acetylcholine, noradrenaline and NO) were involved on those changes, we performed a pharmacological dissection. When strips were tested in NANC conditions (atropine plus guanethidine) there was a decrease in the contractile response that did not showed

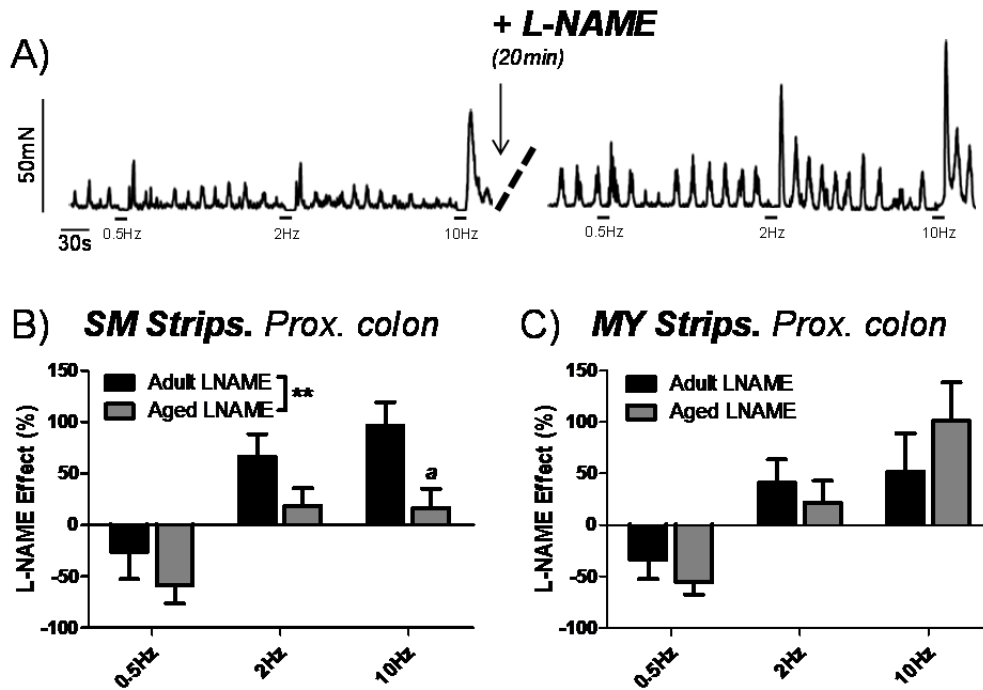


Figure 4. Aging modifies the nitergic component of the proximal colon innervation in SM strips, but not in the MY. **A)** Representative traces displaying the typical pro-contractile effect of the nitric oxide synthase inhibitor, L-NAME, in adult proximal colonic SM strips. **B)** Histogram showing the effect of L-NAME over the off-response to EFS at all the frequencies tested in SM strips from both experimental groups. (The effect is calculated as a percentage of change referred to the previous experimental period) (** $p < 0.01$ Two way ANOVA Adult LNAME vs. Aged LNAME // a $p < 0.05$ Bonferroni posttest Two way ANOVA Adult LNAME vs. Aged LNAME). **C)** Histogram showing the effect of L-NAME over the off-response to EFS at all the frequencies tested in MY strips from both experimental groups. (The effect is calculated as a percentage of change referred to the previous experimental period) (n=10-19 strips from 10-19 animals)

statistically differences for age nor the presence of SmP (data not shown). The NO synthase inhibitor, L-NAME, caused a reduction in the response to 0.5Hz but an increase at 2 and 10 Hz. and in SPCs at the inter-stimulus period. The effects of L-NAME were similar in adult and aged MY strips (Fig. 4B), but the nitergic contribution was higher in adult than in aged SM strips (Fig. 4C, ** $p < 0.01$ Two way ANOVA Adult LNAME vs. Aged LNAME). At the highest frequency tested, the SmP in old animals decreased the

nitergic contribution of My plexus, as revealed by the comparison between Fig 4B and 4C. ...

Contrary to previously described in proximal colon, the responses in strips from distal colon did not showed significant differences caused by the presence of submucosal plexus in any of the experimental groups. However, SM strips from aged animals displayed significantly higher values than strips in adults (Fig. 5) (** $p < 0.01$ Two way ANOVA Adult SM vs.

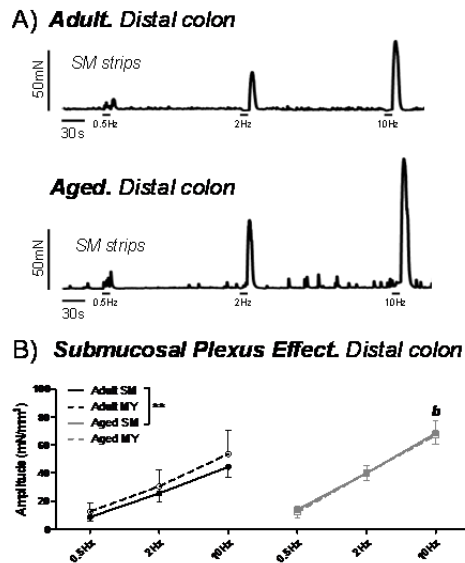


Figure 5. Aging increases the off-response to EFS in SM strips from distal colon. **A)** Representative traces from SM strips showing the difference in the EFS response between adult and aged mice. **B)** Trend graph displaying the mean \pm SEM of the amplitude of the off-response to EFS in SM (solid lines) and MY strips (dashed lines) in both experimental groups. (** $p < 0.01$ Two way ANOVA Adult SM vs. Aged SM) (n = 8-17 strips from 8-17 animals)

Aged SM). Under NANC conditions we found that SM strips from aged animals had higher adrenergic/cholinergic contributions than the same type of strips from adult mice (Fig 6B, * $p < 0.05$ Two way ANOVA Adult A+G vs. Aged A+G) whereas no significant changes were found in MY strips (Fig 6 C). When the effects of L-NAME were tested on the different preparations used in the study, non statistically significant differences were observed in any of the preparations (data not shown).

5. Discussion

Herein, we provide evidence about the impact of aging in the murine colon that

may have great importance in the biology of the aging, specifically in the gut. First, we show that there is a reduction in SPCs in aged proximal colon due to an increase in the nitrergic contribution of the SmP that compensates the loss of nitrergic influence in aged MY strips. Second, myogenic contractile response was slightly impaired in aged animals in both proximal and distal colon. Finally, the neuromuscular function is only altered by age in the distal colon, appearing subtle changes in the contribution of the main neurotransmitters that again are compensated by SmP. All together our findings point to a now pretty well accepted theory claiming that gastrointestinal tract is not dramatically affected by aging but we consider that gut changes associated to age should still be taken in account to design new anti-aging strategies.

Spontaneous activity of the colon relays in a series of different mechanisms that coordinate each other in order to develop either complex movements such as colonic migratory motor complexes (CMMCs) or SPCs. CMMCs generation requires certain amount of intrinsic plexus, as they are abolished in colonic segments smaller than 1cm (19). Muscular strips of the gastrointestinal tract develop SPCs following the occurrence of electrical slow waves primary generated by ICCs (19-22). According to previously reported data by Porcher et. al in 2004 (23), in mice, this motor pattern exhibits a mean frequency of about 4.5 per minute, similar to our results. Although this is a basic phenomenon underlying colonic motility, the number of studies focused on it is really low, especially in mice. This study shows by the first time the effect of aging on spontaneous colonic activity and the differential influence of the

submucous plexus depending on age. Aging reduces SPCs in the presence of the submucosal plexus. The effects of SmP could be attributed to an increase in the nitrergic contribution to the control of SPCs that compensates the age-related decrease in the function of these nerves in aged MyP. A transwall gradient in resting membrane potential across the circular muscle layer has been reported in several species including mice (24-26). In mouse colon the transwall

gradient was due to the release of carbon monoxide (CO) by the submucosal ganglion neurons (26), unlike stomach and intestine where CO is produced by ICCs. We cannot rule out that part of the inhibitory effects of the SmP reported here could be attributed to this phenomenon. A loss of inhibitory effect of L-NAME associated to aging has been already described in the literature (27) but here we report differential neurotransmitters contributions depending of the motor pattern

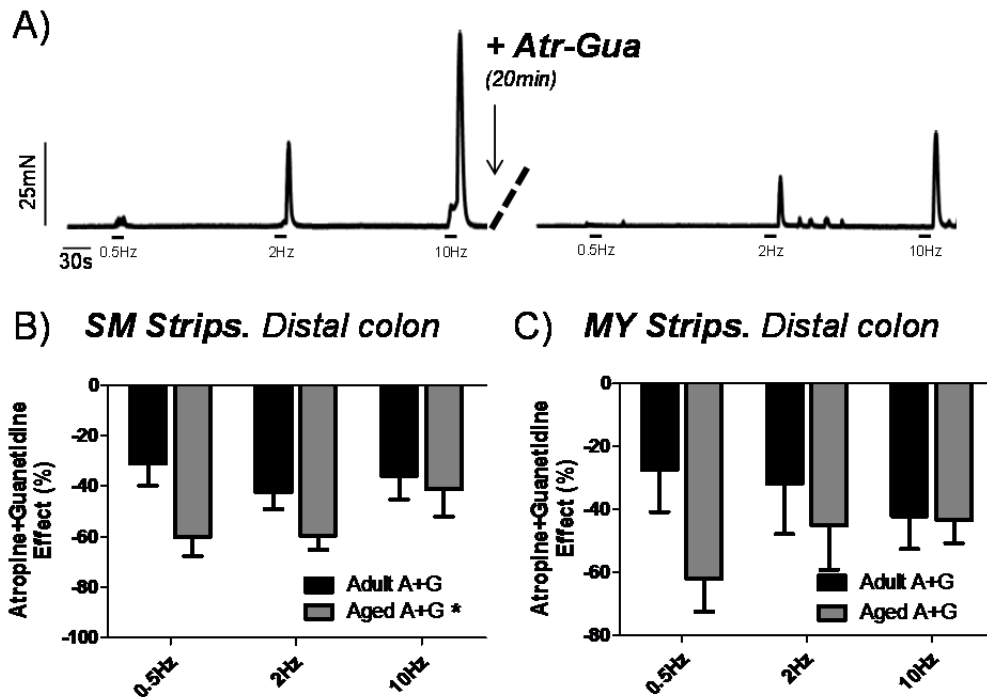


Figure 6. Aging increases the adrenergic-cholinergic component of the distal colon innervation in both types of strips. **A)** Representative traces displaying the typical inhibitory effect of the simultaneous addition of Atropine (10 μM) and Guanetidine (10 μM) in aged distal colonic SM strips. **B)** Histogram showing the effect of atropine and guanetidine over the off-response to EFS at all the frequencies tested in SM strips from both experimental groups. (The effect is calculated as a percentage of change referred to the previous experimental period) (* $p < 0.05$ Two way ANOVA Adult A+G vs. Aged A+G // $a p < 0.05$ Bonferroni posttest Two way ANOVA Adult LNAME vs. Aged LNAME). **C)** Histogram showing the effect of L-NAME over the off-response to EFS at all the frequencies tested in MY strips from both experimental groups. (The effect is calculated as a percentage of change referred to the previous experimental period). (* $p < 0.05$ Two way ANOVA Adult A+G vs. Aged A+G // $a p < 0.05$ Bonferroni posttest Two way ANOVA Adult A+G vs. Aged A+G) (n = 8-17 strips from 8-17 animals)

considered, which confirms the complex regulation of colonic motility in particular and gut motility in general. Although our results also suggest an increase in cholinergic and adrenergic influence of SmP on SPCs, the overall effect of this plexus is an inhibitory one, which points out to a predominant role of nitrergic innervation. The effects of TTX on SPCs, similar to those of L-NAME, reinforce our hypothesis and indicate an age-mediated shift in the myenteric influence over spontaneous activity that is almost entirely compensated by the SmP. The age-associated nitrergic influence of SMP on spontaneous colonic activity described here may have a negative impact on colon contractile state and it could be translated into a delay of colonic transit described in some animals model (28-30) or human (31;32). This is also supported by the age-induced reduction on myogenic contractility of colonic circular smooth muscle layers reported in this study, similar to other organs in the gastrointestinal tract and from different species (8;14;15;30-34).

Unlike the effects on SPCs, aging reduced the response of MY strips to EFS. This effect could not be imputed to reduction of NANC excitatory influences since no differences were found between SM and MY strips after atropine + guanethidine treatment. The effects of L-NAME points out to a slightly, although no significant, increase of the nitrergic contribution in EFS-induced contractility of aged MY strips. In the presence of SMP, an experimental protocol that resembles more the natural environment of the muscle layers, the inhibitory role of SMP reported on SPCs is not present in aged strips but it is in the adult ones, which compensates age-related loss of neurogenic contractility in

MY preparations. According to our results, the study of aging just in the MyP and tunica muscularis externa would not give the complete scene for this physiological process.

In the distal colon there are not age-related effects on neurogenic contractility in MY strips, but the SmP induces a moderate enhancement of EFS-induced contractility in aged animals, due to the increase of the contribution of cholinergic and adrenergic excitatory function. One striking finding in this study is the lack of effects of L-NAME on neurogenic contractility in both adult and aged distal strips, taking into account that L-NAME increased both SPCs and EFS-induced contractility in the proximal segment. We do not have an explanation for this finding. The lack of effects of aging in distal colonic motility in MY strips is in agreement with a previous work from our group that describes that proximal colon have greater basal levels of H_2O_2 than the distal portion thereby creating an environment for more intensive oxidative damage that worsens as the animal ages. In the distal portion, however, age-induced changes in catalase and H_2O_2 production did not correlate with increased lipid peroxidation, suggesting clearly that distal colon copes better with aging (13).

Taking together, our results suggest that there are not dramatic changes in the motility of the aged colon and that compensatory mechanisms from the submucosal plexus, which was considered to have negligible effects on colon contraction, restore colonic motility. Probably this is the reason why data from human colonic transit are equivocal with both a slowing (35-38) and no change in transit (31;32;39) in response to aging. In humans aging per se

appears to have only a minor direct effect on most gastrointestinal functions, mostly because of the functional reserve capacity of the gastrointestinal tract (40). Indeed, it seems to be very well accepted that even in the presence of age-related neuronal or ICC loss, colonic function maintains un-affected (41;42) and those drop could not explain why the incidence of constipation increases considerably with aging. Therefore, the compensatory mechanism shown here neither could be the ultimate cause, but at least we provide new findings about the process of aging in the colon..

6. Acknowledgments:

We thank the technical support of P. Delgado y F. Barriga..7.

7. Funding:

Supported by BFU2007- 60563, BFU2011-24365, RETICEF RD12/0043/0016, FEDER and Junta de Extremadura (GR10009). FEMC was supported by a predoctoral fellowship from the Spanish ministry of science and innovation BES-2008-002749.

8. Disclosure:

PJC and MJP designed the study.

FEMC, LFB and MJP performed the research.

FEMC, PJGP and MJP analyzed the data.

FEMC, PJGP and MJP wrote the paper.

9. Reference List

(1) Campion EW. The oldest old. *N Engl J Med* 1994 Jun 23;330(25):1819-20.

(2) Hall KE, Wiley JW. Neural injury, repair and adaptation in the GI tract. I. New insights into neuronal injury: a cautionary tale. *Am J Physiol* 1998 Jun;274(6 Pt 1):G978-G983.

(3) Camilleri M, Cowen T, Koch TR. Enteric neurodegeneration in ageing. *Neurogastroenterol Motil* 2008 Apr;20(4):418-29.

(4) Talley NJ, O'Keefe EA, Zinsmeister AR, Melton LJ, III. Prevalence of gastrointestinal symptoms in the elderly: a population-based study. *Gastroenterology* 1992 Mar;102(3):895-901.

(5) Kay L. Prevalence, incidence and prognosis of gastrointestinal symptoms in a random sample of an elderly population. *Age Ageing* 1994 Mar;23(2):146-9.

(6) Wiskur B, Greenwood-Van MB. The aging colon: the role of enteric neurodegeneration in constipation. *Curr Gastroenterol Rep* 2010 Dec;12(6):507-12.

(7) Bitar K, Greenwood-Van MB, Saad R, Wiley JW. Aging and gastrointestinal neuromuscular function: insights from within and outside the gut. *Neurogastroenterol Motil* 2011 Jun;23(6):490-501.

(8) Bitar KN, Patil SB. Aging and gastrointestinal smooth muscle. *Mech Ageing Dev* 2004 Dec;125(12):907-10.

(9) de Sousa FC, Neto MH. Morphometric and quantitative study of the myenteric neurons of the stomach of malnourished aging rats. *Nutr Neurosci* 2009 Aug;12(4):167-74.

(10) Thrasivoulou C, Soubeyre V, Ridha H, Giuliani D, Giaroni C, Michael GJ, et al. Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of

- myenteric neurons. *Aging Cell* 2006 Jun;5(3):247-57.
- (11) Cowen T, Johnson RJ, Soubeyre V, Santer RM. Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death. *Gut* 2000 Nov;47(5):653-60.
- (12) Robson LG, Dyall S, Sidloff D, Michael-Titus AT. Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase the neurite outgrowth of rat sensory neurones throughout development and in aged animals. *Neurobiol Aging* 2010 Apr;31(4):678-87.
- (13) Pascua P, Camello-Almaraz C, Camello PJ, Martin-Cano FE, Vara E, Fernandez-Tresguerres JA, et al. Melatonin, and to a lesser extent growth hormone, restores colonic smooth muscle physiology in old rats. *J Pineal Res* 2011 Nov;51(4):405-15.
- (14) Macias B, Gomez-Pinilla PJ, Camello-Almaraz C, Pascua P, Tresguerres JA, Camello PJ, et al. Aging impairs Ca²⁺ sensitization pathways in gallbladder smooth muscle. *Age (Dordr)* 2012 Aug;34(4):881-93.
- (15) Gomez-Pinilla PJ, Camello-Almaraz C, Moreno R, Camello PJ, Pozo MJ. Melatonin treatment reverts age-related changes in Guinea pig gallbladder neuromuscular transmission and contractility. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 Nov;319(2):847-56.
- (16) Huizinga JD, Martz S, Gil V, Wang XY, Jimenez M, Parsons S. Two independent networks of interstitial cells of cajal work cooperatively with the enteric nervous system to create colonic motor patterns. *Front Neurosci* 2011;5:93.
- (17) Takeuchi T, Niioka S, Yamaji M, Okishio Y, Ishii T, Nishio H, et al. Decrease in participation of nitric oxide in nonadrenergic, noncholinergic relaxation of rat intestine with age. *Jpn J Pharmacol* 1998 Nov;78(3):293-302.
- (18) McDougal JN, Miller MS, Burks TF, Kreulen DL. Age-related changes in colonic function in rats. *Am J Physiol* 1984 Nov;247(5 Pt 1):G542-G546.
- (19) Lyster DJK, Bywater RAR, Taylor GS. Regulation of the frequency of myoelectric complexes in the isolated mouse colon. *J GASTROINTEST MOTIL* 1993;5(3):143-51.
- (20) Sarna SK. In vivo signal-transduction pathways to stimulate phasic contractions in normal and inflamed ileum. *Am J Physiol* 1998 Apr;274(4 Pt 1):G618-G625.
- (21) Lyster DJ, Bywater RA, Taylor GS. Neurogenic control of myoelectric complexes in the mouse isolated colon. *Gastroenterology* 1995 May;108(5):1371-8.
- (22) Horowitz B, Ward SM, Sanders KM. CELLULAR AND MOLECULAR BASIS FOR ELECTRICAL RHYTHMICITY IN GASTROINTESTINAL MUSCLES. *Annu Rev Physiol* 1999 Mar 1;61(1):19-43.
- (23) Porcher C, Horowitz B, Ward SM, Sanders KM. Constitutive and functional expression of cyclooxygenase 2 in the murine proximal colon. *Neurogastroenterol Motil* 2004 Dec;16(6):785-99.
- (24) Bauer AJ, Sanders KM. Gradient in excitation-contraction coupling in canine gastric antral circular muscle. *J Physiol* 1985 Dec;369:283-94.
- (25) Hara Y, Kubota M, Szurszewski JH. Electrophysiology of smooth muscle of the small intestine of some mammals. *J Physiol* 1986 Mar;372:501-20.
- (26) Sha L, Farrugia G, Linden DR, Szurszewski JH. The transwall gradient across the mouse colonic circular muscle layer is carbon monoxide dependent. *FASEB J* 2010 Oct;24(10):3840-9.
- (27) Patel BA, Dai X, Burda JE, Zhao H, Swain GM, Galligan JJ, et al. Inhibitory neuromuscular transmission to ileal longitudinal muscle predominates in neonatal guinea pigs. *Neurogastroenterol Motil* 2010 Aug;22(8):909-7.
- (28) Patel B, Fidalgo S, Ranson R, Saffrey J, Yeoman M. Age-related changes in cholinergic and nitrergic signalling in mouse rectum. *Neurogastroenterology & Motility* 2012 Sep 1;24:120.
- (29) Smits GJ, Lefebvre RA. Influence of age on cholinergic and inhibitory

- nonadrenergic noncholinergic responses in the rat ileum. *Eur J Pharmacol* 1996 May 6;303(1-2):79-86.
- (30) Smits GJ, Lefebvre RA. Influence of aging on gastric emptying of liquids, small intestine transit, and fecal output in rats. *Exp Gerontol* 1996 Sep;31(5):589-96.
- (31) Hall KE, Proctor DD, Fisher L, Rose S. American gastroenterological association future trends committee report: effects of aging of the population on gastroenterology practice, education, and research. *Gastroenterology* 2005 Oct;129(4):1305-38.
- (32) Bhutto A, Morley JE. The clinical significance of gastrointestinal changes with aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008 Sep;11(5):651-60.
- (33) Somara S, Gilmont RR, Martens JR, Bitar KN. Ectopic expression of caveolin-1 restores physiological contractile response of aged colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007 Jul;293(1):G240-G249.
- (34) Bitar KN. Aging and neural control of the GI tract: V. Aging and gastrointestinal smooth muscle: from signal transduction to contractile proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 Jan;284(1):G1-G7.
- (35) Melkersson M, Andersson H, Bosaeus I, Falkheden T. Intestinal transit time in constipated and non-constipated geriatric patients. *Scand J Gastroenterol* 1983 Jul;18(5):593-7.
- (36) Madsen JL, Graff J. Effects of ageing on gastrointestinal motor function. *Age Ageing* 2004 Mar;33(2):154-9.
- (37) Wiley JW. Aging and neural control of the GI tract: III. Senescent enteric nervous system: lessons from extraintestinal sites and nonmammalian species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 Nov;283(5):G1020-G1026.
- (38) Madsen JL. Effects of gender, age, and body mass index on gastrointestinal transit times. *Dig Dis Sci* 1992 Oct;37(10):1548-53.
- (39) Evans JM, Fleming KC, Talley NJ, Schleck CD, Zinsmeister AR, Melton LJ, III. Relation of colonic transit to functional bowel disease in older people: a population-based study. *J Am Geriatr Soc* 1998 Jan;46(1):83-7.
- (40) Salles N. Basic mechanisms of the aging gastrointestinal tract. *Dig Dis* 2007;25(2):112-7.
- (41) Bernard CE, Gibbons SJ, Gomez-Pinilla PJ, Lurken MS, Schmalz PF, Roeder JL, et al. Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. *Neurogastroenterol Motil* 2009 Jul;21(7):746-e46.
- (42) Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Sarr MG, Kendrick ML, Shen KR, Cima RR, et al. Changes in interstitial cells of cajal with age in the human stomach and colon. *Neurogastroenterol Motil* 2011 Jan;23(1):36-44.

Journal of Pineal Research. 2011 Nov;51(4):405-15.

MELATONIN, AND TO A LESSER EXTENT GROWTH HORMONE, RESTORES COLONIC SMOOTH MUSCLE PHYSIOLOGY IN OLD RATS

Pascua P1, Camello-Almaraz C¹, Camello PJ¹, Martin-Cano FE¹, Vara E²,
Tresguerres JAF³, Pozo MJ¹

¹Dept of Physiology, Nursing School, University of Extremadura, 10071 Caceres, Spain

²Dept of Physiology, Medicine School, University Complutense of Madrid, 28040
Madrid, Spain

³Dept of Biochemistry, Medicine School, University Complutense of Madrid, 28040
Madrid, Spain.

Running title: Melatonin and GH in aged male rat colon

Correspondence to:

María J. Pozo,
Department of Physiology
Nursing School
Avda Universidad s/n.
10003 Cáceres,
Spain.
E-mail: mjpozo@unex.es

Keywords: aging, apoptosis, colon smooth muscle, growth hormone, inflammation, melatonin, oxidative stress.

CONTENTS

- 1.- Abstract
- 2.- Introduction
- 3.- Material and methods
 - 3.1.- Animals and treatment
 - 3.2.- Tissue preparation
 - 3.3.- Analysis of protein expression by Western blotting
 - 3.4.- Determination of hydrogen peroxide levels
 - 3.5.- Determination of MDA levels
 - 3.6. Catalase activity
 - 3.7. Glutathione peroxidase (GPx) activity
 - 3.8. Solutions and drugs
 - 3.9. Quantification and statistics
- 4.- Results
- 5.- Discussion
- 6.- Acknowledgements
- 7.- Author contributions
- 8.- Reference list

1. Abstract

There is increasing evidence that aging is associated with oxidative damage, inflammation and apoptosis in different cell types. However, there is limited information regarding aging mechanisms in colon smooth muscle. Old male Wistar rats (22 months) were treated for 10 weeks with melatonin or growth hormone (GH). Animals were sacrificed at 24 months of age by decapitation. The colon was dissected and the smooth muscle homogenized. H₂O₂ and MDA content, catalase and glutathione peroxidase (GPX) activity were determined using colorimetric kits. Expression of nuclear factor kappa B (NF- κ B), cyclooxygenase 2 (COX-2), caspases 3 and 9 were determined by Western blot. Aging of colon smooth muscle correlated with an increase in H₂O₂ and MDA levels when compared with young animals in both proximal and distal segments; these changes were associated with a decrease in the catalase activity in the distal colon. Oxidative stress correlated with an increase in COX-2 and NF- κ B expression, which were accompanied by an enhanced expression of the pro-apoptotic enzyme caspase-3 and its upstream enzyme, caspase-9. Melatonin treatment normalized the oxidative, inflammatory and apoptotic patterns, whereas GH replacement although effective in reducing oxidative stress in distal colon, did not reverse the age-related inflammation or apoptosis. These results suggest that melatonin should be the treatment of choice to most effectively recover physiological functions in aged colonic smooth muscle.

2. Introduction

Elderly people frequently suffer from intestinal complaints, which can have a

significant impact on their quality of life (1). Similar to other organs, the gastrointestinal system undergoes structural and functional changes with age (2), which in turn are responsible for alterations in colonic transit (3) leading to constipation, a prevalent bowel dysfunction in the elderly according to epidemiological studies (4;5). Colonic dysfunction in the elderly may be due to changes in the mucosa, the enteric nervous system or the smooth muscle layers.

Age induces an impairment of the colonic transmucosal ionic transport (6), a decrease in cAMP-dependent secretion of the chloride ion and a reduction in the density in non-goblet cells in colonic crypts, which is paralleled by reduced stool water content in mature animals (7). In the enteric nervous system of the guinea pig colon there is an age-dependent fall in the density but not in the number of neurons in the myenteric plexus and the circular muscle nerve fibers (8). Although, the number of neurons in the human colon declines with age, there is a sparing of nNOS-positive neurons. However, this change was not accompanied by reductions in the total volume of neuronal structures suggesting compensatory arrangements in the remaining neurons (9). Changes in the submucosal plexus and deterioration of sympathetic fibers (swollen axons and terminals) have also been reported in aged rats (10). At the smooth muscle level, lower contractile response to agonists has been reported, which may be due to alterations in Ca²⁺ homeostasis (11) and to other signal transduction pathways (12).

According to the free radical theory of ageing (13), many cellular and tissue changes observed in aged animals are attributed, at least in part, to free radical

excess and/or to scavenger system failure. In the gut, and more precisely in the colonic smooth muscle the molecular mechanism of aging is yet to be fully elucidated, despite of reports indicating that injury of mitochondrial function, decline of antioxidant capability and increase of apoptosis are important reasons for the aging of human colonic epithelium (14). It is clear from studies in inflammatory bowel diseases that the integrity of the colonic epithelial surface barrier is paramount in maintaining immune quiescence within the colonic tissues and preventing the colonic immune system from mounting an immune response against the high concentration of bacterial antigens that are poised to invade the normally sterile subepithelial environment (15). Colonic aging, according to this, could be due to an oxidative stress imbalance in the muscularis externa, which would induce chronic inflammation and the activation of apoptotic pathways.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is synthesized and secreted during the dark phase of the day by the pineal gland of almost all species under sympathetic control activated by the central pacemaker, the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (16). The main extra-pineal source of melatonin is the gastrointestinal tract, where it is produced by enterochromaffin cells (17). It has free radical scavenging and antioxidant properties and upon the scavenging generates other compounds that also retain strong reducing potential, which explains the high efficiency of melatonin as an antioxidant compared to other naturally occurring antioxidants (18-20). We have previously shown that melatonin restores smooth muscle function altered by increased

oxidative stress-related conditions such as inflammation and aging, including the gastrointestinal smooth muscle (21-27).

Previous results from our group have shown that growth hormone (GH) might play an important role in the prevention of aging in the rat as shown by the recovery of several age affected physiological parameters related to cardiovascular activity, liver metabolism, bone, central nervous system (CNS), and immune system function (28-31). The beneficial effects of GH against aging may relate to a decrease in the apoptotic pathways and oxidative stress in CNS, skin, liver and heart (32-34). Regarding the colon, it has been shown that GH has antiapoptotic effects in several cell lines, including human colonic adenocarcinoma cells (35). In addition, it has been reported that patients with achromegaly have reduced apoptosis in colonic mucosa (36). These effects are related to the reported increase in anti- and to the reduced levels of pro-apoptotic proteins, respectively, lowering apoptosis in colonic epithelial cells from transgenic mice over-expressing GH receptors through activation of several kinase (p38, p44/42 and PI3) pathways (37). Effects of GH on the gut smooth muscle are lacking. In addition, there are no reports on the effects of GH supplementation on the colonic smooth muscle of aged animals.

Therefore, this study investigated the effects of melatonin and GH supplementation on the oxidative stress status, antioxidant defense, and the presence of inflammation and apoptosis in aged colonic smooth muscle from aged male Wistar rats..

3. Material and Methods

3.1. Animals and treatment

Male Wistar rats were used in the study and were divided into two groups according to age: young adults (2 months-old) and aged (24 months-old). Animals were housed in light (12 hr light–12 hr dark cycle)- and temperature (20° C)-controlled rooms and had free access to food and water. A group of aged animals received melatonin (1mg/kg/day) for 10 weeks between the 22nd and 24th month of age dissolved in the drinking water. The concentration was adjusted for the daily water intake determined prior to the initiation of the treatment. Melatonin was initially dissolved in ethanol, and the final ethanol concentration in the drinking water was 0.1%. Untreated animals also received this concentration of ethanol. GH was administered at a dose of 2 mg/kg/day, given in two daily subcutaneous injections also for the same period of time. Animals were sacrificed by decapitation and the colon was collected and processed as described below. The animals received humane care according to the Guidelines for Ethical Care of Experimental Animals of the European Union. The study was approved by the ethical committee of the University Complutense of Madrid.

3.2. Tissue preparation

After sacrifice, proximal and distal colon were removed and immediately placed in cold Krebs-Henseleit solution (for composition, see Solutions and drugs) at pH 7.35. The colon was longitudinally opened, the mucosa was removed under microscope dissection and the muscularis externa, which consists of an inner circular and an outer longitudinal muscle layers and the myenteric

plexus between them, was quickly frozen for subsequent study of protein expression and enzymatic activity.

Frozen samples from proximal and distal colon smooth muscle were pulverized in liquid nitrogen, homogenized in lysis solution (for composition, see Solutions and drugs) using a homogenizer (OMNI International) and then sonicated for 5 s for protein expression analysis. Lysates were centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C to remove nuclei and intact cells.

For H₂O₂ and MDA content and enzymatic assays, the samples of colon were pulverized in liquid nitrogen and homogenized in 4–8 vol (per weight tissue) of cold buffer (for composition, see Solutions and drugs). The homogenate was centrifuged at 8,000 g at 28 °C for 15 min and the supernatant was used for the assay of GPx activity.

Protein concentrations were measured in the supernatant by bicinchoninic acid (BCA) assay (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA).

3.3. Analysis of protein expression by Western blotting

Protein extracts (25–30µg) were heat denaturalized at 95°C for 5 min with DTT, separated by 12.5% polyacrylamide-SDS gels, and then transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked for 1 h at room temperature using 5% (w/v) nonfat milk dissolved in TBST buffer (for composition, see Solutions and drugs) and incubated overnight at 4°C with the respective primary antibodies: mouse anti-NF-kB p65 (1:250, BD Bioscience, Erembodeguen, Belgium), mouse anti-COX-2 (1:500, BD Biosciences, Erembodeguen,

Belgium), rabbit anti-caspase-3, rabbit anti caspase-9 and anti-cleaved caspase-9 (1:1,000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Rabbit anti-actin antibody (1:28,000, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) was used as protein loading control. After washing, membranes were incubated for 1 h at room temperature with anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:7,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000; Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). The blots were then detected with the Supersignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL, USA). The intensity of the bands was quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) and normalized respect to actin content.

3.4. Determination of hydrogen peroxide levels

To quantify cellular H₂O₂ we used a hydrogen peroxide cell-based assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor; MI, USA). This is a fluorometric method based in the reaction of H₂O₂ with 10-acetyl-3,7-dihydrophenoxazine (ADHP) in presence of horseradish peroxidase. The product (resofurin) is a substance highly fluorescent with an emission wavelength of 590 nm which was measure by a fluorescence spectrophotometer (Hitachi High Technologies Corporation, Japan).

3.5. Determination of MDA levels

MDA production was determined by the thiobarbituric acid (TBA) method. This is a colorimetric method based on the one described by Recknagel and Glende (38) with little modifications. The tissue samples

of colonic smooth muscle of colon, were first homogenized in saline phosphate buffer, centrifuged (3000×g, 10 min) and the supernatant was deproteinized. Then, these samples react overnight with a solution containing: HCl (0.25 mmol/l), trichloroacetic acid (15%), TBA (3 mmol/l) and 2- tetrabutyl-4-methylphenol (0.1%) at room temperature in darkness. Finally, the absorbance was measured spectrophotometrically at 533 nm, using 1-1-2-3-tetraethoxypropane (0,1 μM) as standard.

3.6. Catalase activity

Catalase activity was determined by Cayman's Catalase Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor; MI, USA). The method is based on production of formaldehyde by catalase in the presence of methanol. This product can be measured colorimetrically with Purpald, a chromogen which upon oxidation changes from colorless to a purple color (540nm) determined by a fluorescence spectrophotometer (Hitachi High Technologies Corporation, Japan).

3.7 Glutathione peroxidase (GPx) activity

The activity was determined by a glutathione peroxidase assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor; MI, USA). This method measures glutathione peroxidase (GPx) activity indirectly by a coupled reaction with glutathione reductase (GR). The rate of decrease in absorbance at 340 nm (associated to the oxidation of NADPH to NADP⁺ when oxidized glutathione (GSSG) is recycled to reduced glutathione (GSH)) is directly proportional to the GPx activity.

3.8. Solutions and drugs

The Krebs-Henseleit solution contained (in mM) 113 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, and 11.5 D-glucose. This solution had a final pH of 7.35 after equilibration with 95% O₂-5% CO₂. The lysis solution contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.5% (wt/vol) NaN₃, 1 mM EGTA, and 0.4 mM EDTA supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Complete, EDTA-free and PhosSTOP, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). The Tris Buffered Saline (TBS) solution contained 200 mM trizma base, 1.4 M NaCl and pH 7.6. The TBST solution contained TBS solution with Tween 0.2%. The cold buffer for enzymatic assays contained 50 mM Tris-HCl buffer (pH = 7.5), 5 mM EDTA and 1 mM 2-mercaptoethanol.

3.9. Quantification and statistics

Data are given as mean \pm standard error of the mean. N values are referred to animals, since from each animal only one sample (proximal and distal) was processed for analysis. To assess the effects of age and treatment on the measured parameters while also controlling for the segment of colon we performed a two-way ANOVA, with 4 levels for the factor "age" (young, old, melatonin-treated and GH-treated) and 2 for the factor "colon segment". After analysis of the main factor effects (age and colon segment), we also performed planned comparisons (least squares distance) between selected pairs of samples (old vs. young, melatonin and GH, and proximal vs distal within each age group). We indicate the F, and the associated probability, for the

main effects, and the P for each specific comparison. Differences were considered significant at $P \leq 0.05$. For western blot data, all density values were normalized to the actin content of the considered sample.

4. Results

Levels of H₂O₂ have used as an index of the oxidative stress in the colonic muscular layers. The ANOVA analysis of H₂O₂ levels in the colon samples from the different experimental groups in the study showed a statistically significant effect of age/treatment ($F=8.92$, $P < 0.00019$) and the colon segment considered ($F=34.4$, $P < 0.000002$). Aging induced a clear and statistically significant increase in H₂O₂ levels as observed in Fig. 1, both in pooled data (Fig. 1A, $P < 0.001$) and also when separating proximal and distal colon samples (Fig. 1B, $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). H₂O₂ content was higher in the proximal than in the distal colon, for both young and aged animals (Fig. 1C, $P < 0.05$ and 0.01 respectively). Melatonin treatment decreased significantly H₂O₂ content in the proximal and overall colon ($P < 0.001$), although this effect did not reach statistical significance in the distal segment. GH treatment was also effective in preventing the age-induced H₂O₂ increase in the overall ($P < 0.05$) and distal colon ($P < 0.01$), but it did not reach significance in the proximal segment. Note that the degree of reduction and the significance levels attained with GH treatment in the proximal and overall colon were lower than those reached with melatonin (Fig. 1). Actually, melatonin reduced H₂O₂ levels even below those present in the young group considering either the global and proximal colon (and approached them in the distal colon), reaching significant differences

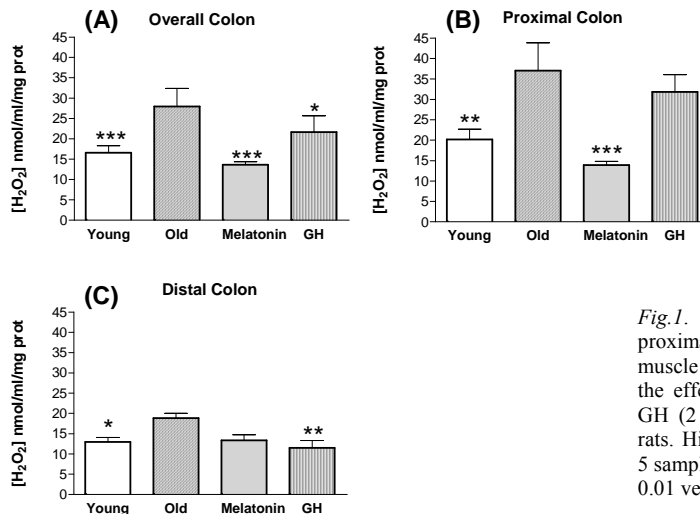


Fig.1. H_2O_2 content in (A) overall, (B) proximal and (C) distal colonic smooth muscle from young and old male rats and the effect of melatonin (1mg/kg/day) and GH (2 mg/kg/day) treatment in old male rats. Histograms represent mean \pm SEM of 5 samples. ** $P < 0.01$ versus old ; *** $P < 0.01$ versus old.

when compared with GH effects ($P < 0.05$ and 0.001 in pooled data and proximal colon, respectively). MDA is a hallmark of oxidative damage in cellular lipids. In our experimental conditions age induced a significant effect ($F = 4.6$, $P < 0.009$) in MDA content. In the proximal colon of aged rats average level was significantly higher than in young rats (Fig. 2, $P < 0.05$), although the increase observed in distal and overall colon was not significant. Treatment

with melatonin and GH were able to induce a significant decrease in proximal (Fig. 2B, $P < 0.01$) and distal colon (Fig. 2C, $P < 0.001$), resulting also in a reduction of the overall colonic MDA in the case of melatonin (Fig. 2A, $P < 0.01$). Similarly to H_2O_2 , MDA content was higher in the proximal than in the distal colon ($F = 51.4$, $P < 0.00001$), but statistical significance was only present when comparing proximal and

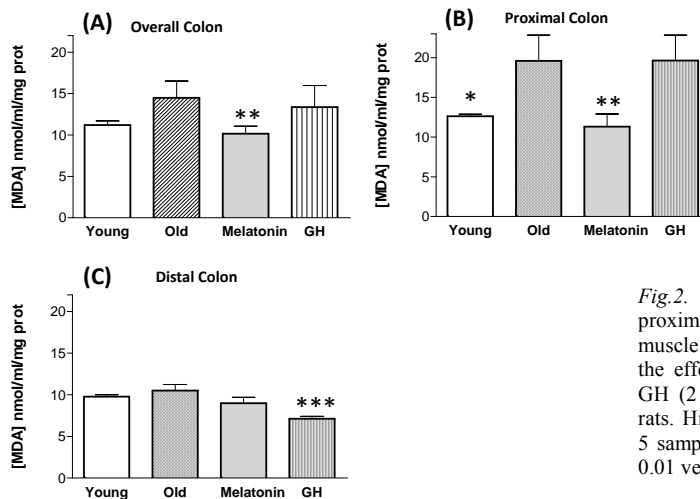


Fig.2. MDA content in (A) overall, (B) proximal and (C) distal colonic smooth muscle from young and old male rats and the effect of melatonin (1mg/kg/day) and GH (2 mg/kg/day) treatment in old male rats. Histograms represent mean \pm SEM of 5 samples. * $P < 0.05$ versus old, ** $P < 0.01$ versus old, *** $P < 0.01$ versus old.

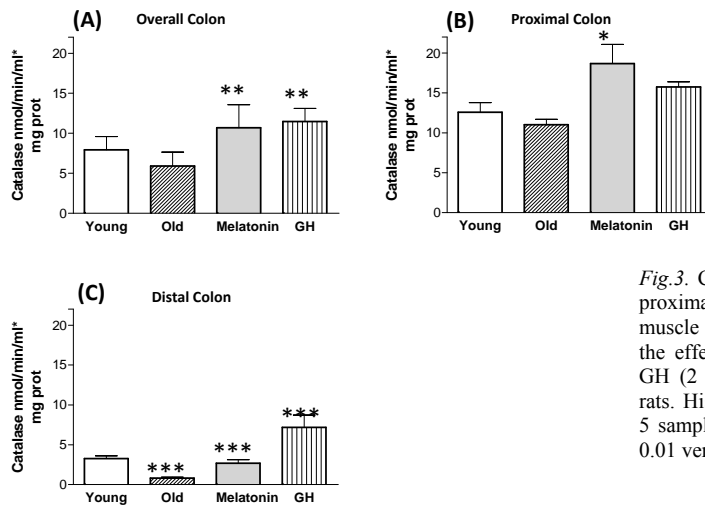


Fig.3. Catalase activity in (A) overall, (B) proximal and (C) distal colonic smooth muscle from young and old male rats and the effect of melatonin (1mg/kg/day) and GH (2 mg/kg/day) treatment in old male rats. Histograms represent mean \pm SEM of 5 samples. * P < 0.05 versus old, ** P < 0.01 versus old, *** P < 0.01 versus old.

distal levels from old and GH-treated rats.

Two enzymes, catalase and GPx, are responsible for the removal of H₂O₂. Catalase is regarded as the main enzyme for the removal of the endogenous H₂O₂. The ANOVA analysis of our data showed that age/treatment (F = 27.93, P < 0.000001) and colon segment (F = 297.3, P < 0.000001) did exert influence on colonic catalase. Thus, aged colon showed a decrease in catalase activity which was considered significant in the distal but not in the proximal colon (P < 0.001, Fig 3). Treatment with melatonin or GH resulted in an increase in its activity, especially in the distal colon (Fig. 3B, P <

0.001). Melatonin treatment also significantly increased catalase activity in the proximal colon (11.01 \pm 0.70 vs 18.67 \pm 2.40 nmol/min/ml/mg protein, P < 0.05). Regarding segment-specific changes in this enzyme, proximal colon displayed higher values of activity than distal colon in all experimental groups (P < 0.05 or lower).

GPx is the other key enzyme for the regulation of H₂O₂ levels. Although ANOVA showed the influence of age/treatment on GPx activity (F = 4.9, P < 0.006), aging alone had no significant effects, in spite of the slight reduction in the activity of the enzyme both in proximal and

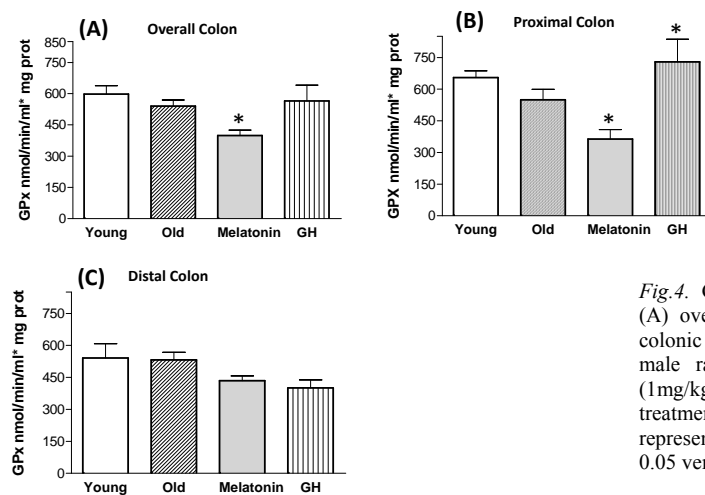


Fig.4. Glutathione Peroxidase activity in (A) overall, (B) proximal and (C) distal colonic smooth muscle from young and old male rats and the effect of melatonin (1mg/kg/day) and GH (2 mg/kg/day) treatment in old male rats. Histograms represent mean \pm SEM of 5 samples. * P < 0.05 versus old.

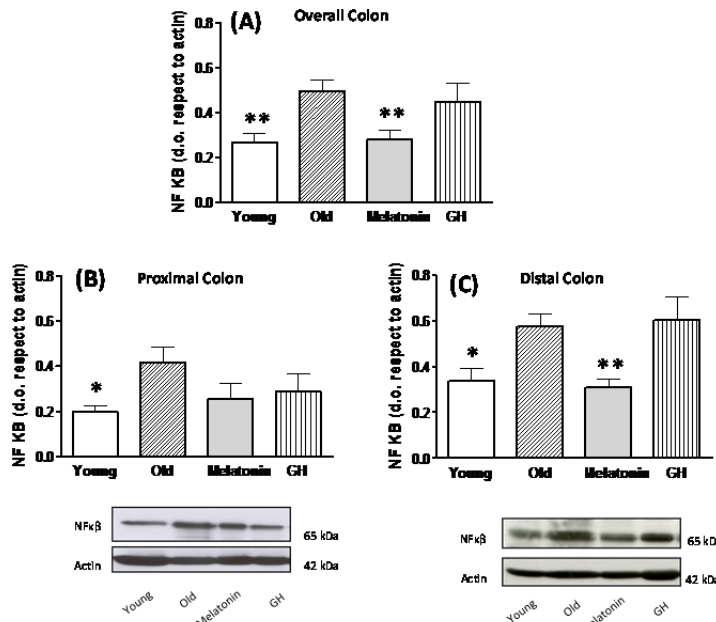


Fig.5. NF-κB expression in (A) overall, (B) proximal and (C) distal colonic smooth muscle from young and old male rats and the effect of melatonin (1mg/kg/day) and GH (2 mg/kg/day) treatment in old male rats. The histogram represents summarized data (n = 6) of changes in NF-κB expression in the different experimental groups. For each experimental group the NF-κB band optic density is expressed respect to that of actin to correct the amount of protein loaded. Under B and C histograms we show representative Western blots on colonic proximal (B) and distal (C) smooth muscle.

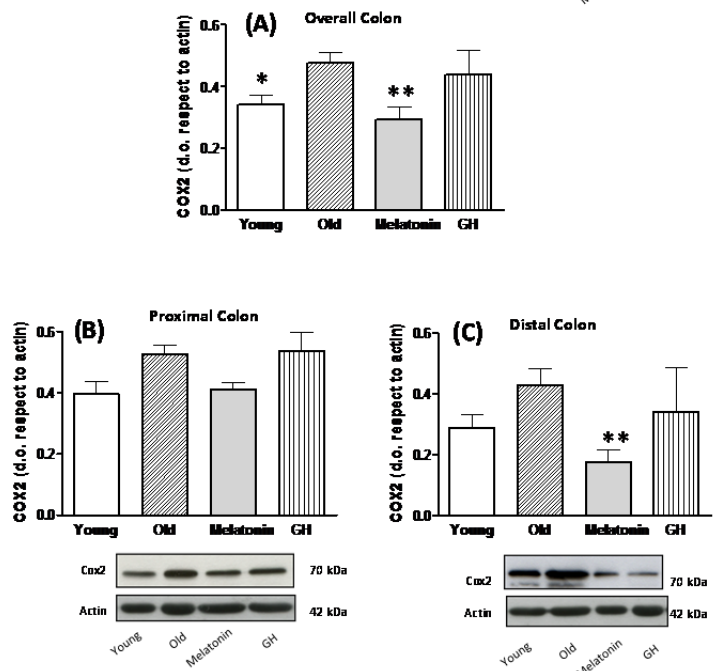


Fig.6. COX-2 expression in (A) overall, (B) proximal and (C) distal colonic smooth muscle from young and old male rats and the effect of melatonin (1mg/kg/day) and GH (2 mg/kg/day) treatment in old male rats. The histogram represents summarized data (n = 6) of changes in COX-2 expression in the different experimental groups. For each experimental group the COX-2 band optic density is expressed respect to that of actin to correct the amount of protein loaded. Under B and C histograms we show representative Western blots on colonic proximal (B) and distal (C) smooth muscle.

distal colon segments (Fig. 4). Melatonin did not prevent the effect of aging. In fact, the activity of GPx was further depressed in the proximal colon of melatonin-treated rats

(Fig 4, P < 0.05). GH treatment did not affect colonic GPx activity, although it was able to prevent the age-induced decreased of GPx in proximal colon (P < 0.05).

NF- κ B is known to be a redox-sensitive protein that plays a central role in immune responses and inflammation. So, it could be possible that the increased oxidative stress found in colonic smooth muscle would induce changes in this transcription factor leading to inflammation. To explore this hypothesis, we analysed the expression of the p65 NF- κ B subunit, essential for nuclear localization and binding to specific DNA sequences. ANOVA analysis indicated that age/treatment did in fact modify the expression of NF- κ B ($F=5.7$, $P < 0.002$). As observed in Fig. 5, we found that NF- κ B was significantly enhanced in the colon of aged animals, considering overall ($P < 0.001$), proximal ($P < 0.05$) and distal colon ($P < 0.05$).

Being COX-2 one of the target genes of NF- κ B, the expression of this enzyme in colonic smooth muscle we also analyzed. The observed changes of COX-2 were qualitatively similar to those found in NF- κ B (Fig. 6), although the increase in aged individuals was statistically significant only in global colon ($P < 0.05$). Melatonin treatment reduced significantly the levels of both NF- κ B and COX-2 in the whole ($P < 0.01$, for both) and the distal colon ($P < 0.01$, for both). In proximal colon the effect of melatonin was still present but not statistically significant. Treatment with GH was less effective in preventing age-induced increases in NF- κ B and COX-2. In fact, GH treatment even slightly increased COX-2 in proximal colon and NF- κ B in distal colon. ANOVA analysis also indicated that colonic segment did not influence both NF- κ B and COX-2 expression in adult or aged animals.

To determine whether aging correlates with changes in apoptotic pathways by western blot the expression of

caspases 9 and 3, key proteases involved in the apoptotic cascade, were assayed by western blot. Following ANOVA analysis, we found that the expression of the activated (cleaved) forms of both C9 and C3 (cC9, cC3) were significantly changed by age/treatment ($F = 12.8$, $P < 0.000003$ and $F = 18.6$, $P < 0.000001$, respectively). Age significantly increased both cC9 ($P < 0.01$) and cC3 ($P < 0.001$) in proximal (Fig. 7B & 8B,) and distal colon (Fig. 7C & 8C, $P < 0.001$, for both). Consequently, this increase was also clear-cut in the overall colon for the two caspases (Fig. 7A & 8A, $P < 0.001$, for both).

Treatment with melatonin inhibited the increase of cC9 in proximal (Fig. 7B, $P < 0.05$) and distal colon (Fig. 7C, $P < 0.01$), as well as in the whole colon (Fig. 7A, $P < 0.001$). Melatonin also inhibited cC3 in aged rats (Fig. 7, $P < 0.05$, 0.001 and 0.05 , for proximal, distal and whole colon, respectively). GH treatment had inhibitory effects on the expression of cC9 in the distal ($P < 0.01$) and global colon ($P < 0.001$), but it did not reach significance in the proximal colon. Regarding the expression of cC3, GH showed no significant effects neither in proximal nor distal colon.

The colonic segment was found to be significant for cC9 and cC3 expression ($F = 6.9$ and 48.8 , $P < 0.01$ and 0.001 respectively). Levels were significantly higher ($P < 0.05$ or lower) in distal colon for cC3 in all experimental groups, but for cC9 expression differences between proximal and distal segment were only statistically significant in aged and melatonin-treated rats. Similar results were obtained when the ratio cleaved caspase/total caspase was analysed, for both C9 and C3 (data not shown).

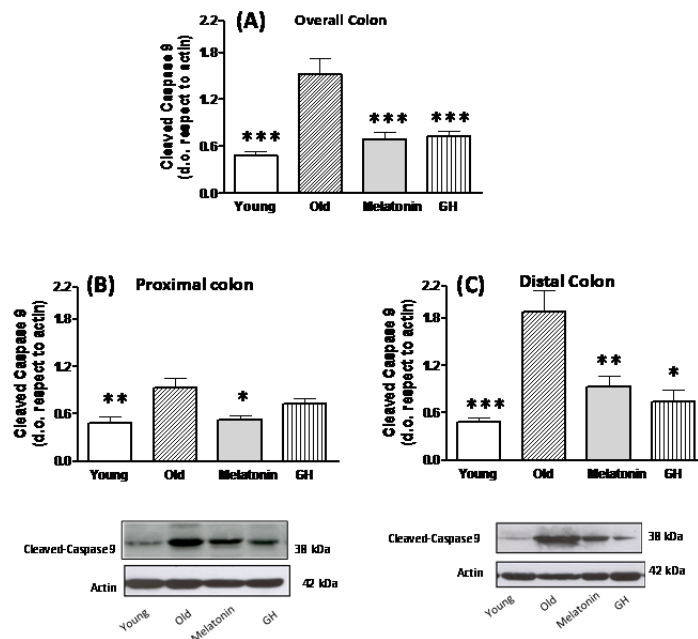
5. Discussion

This report shows for the first time that aging induces oxidative stress in the muscularis externa of the male rat colon. The increase in H₂O₂ parallels the rise in MDA content, which indicates that reactive oxygen species (ROS) induced lipidic peroxidation in colonic smooth muscle. This alteration would be responsible for the decrease in contractility described in colon (12) and other gastrointestinal smooth muscles (21). Concomitantly, there is an increase in pro-inflammatory and pro-apoptotic factors that could further worsen the impaired contractility in the presence of ROS. Melatonin treatment reduced the oxidative stress insult, through a direct antioxidant effect together with restoration of catalase activity. The observed reduction in inflammation and apoptosis support the beneficial effects of melatonin in colon aging. GH supplementation, although less effective than melatonin, had also a beneficial role against detrimental age-related effects in colon.

Epidemiological studies show that prevalence of motility dysfunction in colon is higher in older than in younger adults (39). No age-related changes in colon oxidative stress status have been reported yet. Our study demonstrates for the first time an age-related increase in H₂O₂ content of the muscular layer of male rat colon, which makes it a potential candidate to contribute to some of the observed alterations in colonic motility reported during aging. This role was supported by the finding that incubation of the normal rat colonic muscle strips with H₂O₂ suppressed ACh-induced response in a similar extent than that seen in the inflamed colon (40) and by the evidence described in this paper that lipid peroxidation was also increased in aged colon.

Our current data show the proximal colon to have greater basal levels of H₂O₂ (more than 100%) than the distal portion, thereby creating an environment for more intensive oxidative damage probably as a consequence of its proximity to the caecum, and the consequent exposure to oxidized

Fig.7. Caspase-9 expression in (A) overall, (B) proximal and (C) distal colonic smooth muscle from young and old male rats and the effect of melatonin (1mg/kg/day) and GH (2 mg/kg/day) treatment in old male rats. The histogram represents summarized data (n = 8) of changes in Caspase-9 expression in the different experimental groups. For each experimental group the Caspase-9 band optic density is expressed respect to that of actin to correct the amount of protein loaded. Under B and C histograms we show representative Western blots on colonic proximal (B) and distal (C) smooth muscle.



food particles, toxins or different bacterial microflora that contribute to generate reactive metabolites. This environment could also result from an impaired removal of H₂O₂ by antioxidant defences such as catalase and GPx enzymes. Similar to previous findings (41), catalase antioxidant enzyme activity in the current study is higher in the proximal colon, whereas GPx activity is similar in both segments. Furthermore, despite the elevated content of H₂O₂ in the proximal colon, levels of basal MDA did not differ significantly between the two intestinal sites. This suggests that under basal conditions, the antioxidant enzymes in the proximal colon are sufficient to restrict, but not to reduce, oxidative lipid damage due to elevated ROS. However, this defence is insufficient during aging, since an 85% increase in the H₂O₂ levels in proximal colon of aged rats was detected, despite the presence of similar CAT and GPx activities to those found in young rats. This seemed to suggest that aging did increase the production of this oxidant and that antioxidant defences were not effective enough, as demonstrated by the increase in the levels of MDA in aged proximal samples.

In distal colon, where aging did reduce catalase by 75% and H₂O₂ by 50%, no increase in lipid peroxidation was found, indicating that distal colon is better able to cope with aging. Similar to our findings, proteomic analysis has shown an age-related decrease in the expression of catalase and GPx in human colonocytes (14).

Initial insights into molecular events associated with intestinal, including colonic, aging, were obtained by microarray analysis in epithelial cells (reviewed in (42)). Genes that showed an elevated expression included

enzymes involved in fatty acid oxidation, ATP production, ribosomal proteins and cell surface antigens with implications in tumorigenesis, signal transduction and neurotransmitter turnover. Despite the 3.9 fold increase reported for the gene encoding for mitochondrial ATP synthase (43) the expression level of this enzyme is reduced in old colonocytes (14), suggesting aging-induced changes in transcription and/or translation mechanisms that drives to alterations in the respiratory chain, energy production and mitochondria function. There is evidence supporting that the decline of mitochondrial function with aging is likely to be a major contributor to cellular, tissue and organismal aging. Thus, our group has reported decreased ATP production in the liver of old male and female Wistar rats as consequence of the impairment in mitochondrial function with age (44;45) which was reverted by GH or melatonin treatment (33). In keeping with this, it has been previously described in rat colonic smooth muscle that the aging process affects mitochondrial function and morphology (11). Thus, the mitochondria of aged rats displayed a decreased number of well-defined cristae and disruption of membranes, suggesting mitochondrial deterioration. This was confirmed by the decrease in the fluctuations of mitochondrial membrane potential in aged animals in relation to the controls.

Different screening techniques have revealed that mammalian aging is associated with the activation of NF- κ B transcription factor system (for review see (46)). The NF- κ B system is a defence system concerned with immune responses and different external and internal dangers, such as oxidative and genotoxic stress. This

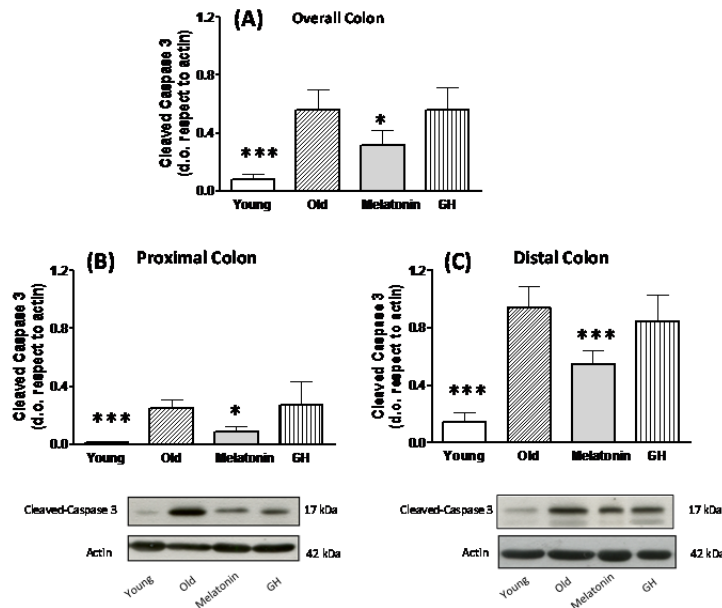


Fig. 8. Caspase-3 expression in (A) overall, (B) proximal and (C) distal colonic smooth muscle from young and old male rats and the effect of melatonin (1mg/kg/day) and GH (2 mg/kg/day) treatment in old male rats. The histogram represents summarized data ($n = 6$) of changes in caspase-3 expression in the different experimental groups. For each experimental group the caspase-3 band optic density is expressed respect to that of actin to correct the amount of protein loaded. Under B and C histograms we show representative Western blots on colonic proximal (B) and distal (C) smooth muscle.

transcription factor is activated via the selective phosphorylation, ubiquitination and degradation of its inhibitor protein I- κ B thereby allowing translocation of NF- κ B into the nucleus where it upregulates the transcription of a variety of molecules including the enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) (47). Similarly to other organs and tissues (reviewed in (34)), we report here that in colonic smooth muscle aging increases the expression of NF- κ B and COX-2, two proteins related to acute and chronic inflammation, which suggests a role for the two proteins in the process of aging in colonic muscle.

The increase in NF- κ B and COX-2, correlates with increased activation of caspases 9 and 3, suggesting a possible relationship between pro-inflammatory and pro-apoptotic factors. The idea that NF- κ B is pro-apoptotic is, however, controversial for several reasons. Elevated NF- κ B activity is associated with increased tumorigenesis (48)

whereas decreasing its activity can inhibit tumorigenesis (49). Consistent with this, NF- κ B targets several anti-apoptotic genes and can protect cells from apoptosis, therefore increasing its oncogenic potential (50). In fact, NF- κ B and COX-2 inhibitors have been tested in clinical trials to prevent human cancer at several sites (50). However, inactivation of NF- κ B can also promote tumorigenesis (51) and NF- κ B has been proposed to be required for p53-induced apoptosis (52). Data from our study support the pro-apoptotic role of NF- κ B.

There is accumulating evidence that dysregulation of apoptosis contributes to age-related diseases including neurodegenerative diseases, osteoarthritis, cardiovascular diseases, and cancer (53). Apoptosis is a genetically programmed cell death and triggers a highly ordered decomposition of DNA and proteins (54) and its regulation is critical for tissue homeostasis. Over-activation of apoptosis

may cause loss of constituent cells and result in tissue dysfunction. Conversely, if cells are highly resistant to apoptotic stimuli, tissues may inappropriately retain also those cells prone to mutations and potentially develop neoplasia. It is generally accepted that aging-related cellular dysfunction in post-mitotic tissues is associated with loss of cells due to high susceptibility to apoptotic stimuli (53). If this is the case of colonic smooth muscle, as suggested by our data, a decreased number of smooth muscle cells could in part explain the age-related decreased in contractility described in gastrointestinal smooth muscle (27;53;55). Our results are in keeping with previous results in colon smooth muscle describing an increase in apoptosis related to age-induced mitochondrial dysfunction (11). In addition, it has been shown in aged human colonic epithelial stem cells that mitochondrial DNA mutations cause respiratory chain deficiencies that attenuates cell proliferation and increases apoptosis, leading to decreased crypt cell population (11). An increase in apoptosis in aged animals has also been demonstrated in colonic epithelial cells in response to the genotoxic carcinogen, azoxymethane (56). All these evidences suggest that in colon aging courses with apoptosis and reduction of organ function.

It is noteworthy that melatonin supplementation ameliorates age-related H₂O₂ and MDA output in colon smooth muscle through an increase in catalase activity. This improvement parallels with a reduction in NF- κ B and COX-2 expression and normalization of apoptosis, which suggest a recovery of colon function. Beneficial effects of melatonin occurs both in proximal and distal colon, although its

effects are more prominent in proximal colon, in keeping with our finding of higher oxidative stress and inflammation and apoptosis markers in this colon segment. We have previously reported that melatonin supplementation improves smooth muscle function deteriorated by either aging (21;24;25;27) or inflammation (23;26) through normalization of intracellular calcium homeostasis, mitochondrial membrane potential, Ca²⁺ sensitization mechanisms or neuromuscular function. These effects were also accompanied by restoration of oxidative stress and melatonin secretion by enterochromaffin cells in the case of aged ileum and colon (57). These results agree with data in other tissues (33;33;58-60).

Despite the beneficial effects reported for GH supplementation in liver, central nervous system and cardiovascular system (28;31;33), our data suggest that GH is less effective in the amelioration of age-induced changes in oxidative stress, inflammation and apoptosis in colon. Conversely to what we observed for melatonin, GH is more effective in distal colon and did not induce any significant change in the proximal segment. In distal colon GH treatment reduced oxidative stress, but did not normalize inflammatory markers. It is very remarkable that GH, which has been shown to reduce apoptosis in intestinal epithelial cells leading to repair and proliferation, did not activate caspase-3 in colonic smooth muscle, the final effector of the apoptotic pathway. One would expect GH-induced regulation of both proliferation and apoptosis towards a physiological balance counteracting the negative changes induced by aging. A possible explanation for our results could be the lack of evidences of

the presence of GH receptors in colonic smooth muscle. In keeping with this, antiapoptotic effects in colonic epithelial cells from transgenic mice overexpressing bGH were abolished blocking GH receptor activity (37). In addition, it could also be possible that the effects of GH on apoptosis would depend on NF- κ B signaling, which remains unchanged under GH treatment. In fact, in Ba/F cells, GH prevents apoptosis through activation of NF- κ B leading to increased Bcl2 and Bad levels (61). Additional studies are needed to bring some light into this paradox.

All together, our results support the beneficial effects of melatonin to prevent age-related oxidative stress, inflammation and apoptosis, which would preserve colonic function decreasing the incidence of motility-related dysfunction and improving quality of life in the elderly. Although GH treatment also reduces oxidative stress in aged distal colon, its lack of effects on two important processes such as inflammation and apoptosis, makes melatonin the treatment of choice for preventing colon aging.

6. Acknowledgements

The authors thank Purificación Delgado and Fatima Barriga for technical assistance. This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2007-60563 & SAF2007-66878-CO201) Instituto de Salud Carlos III (RETICEF: RD06/0013/0002 & RD06/0013/1012), Junta de Extremadura (GRU0921, GR10009) and FEDER. There is not conflict of interest to any institution or any journals.

7. Author contributions

Significant manuscript writers: Maria J Pozo, Pedro J Camello. Significant manuscript reviewer: JAF Tresguerres, MC Camello-Almaraz. Concept and design: Maria J Pozo, and JAF Tresguerres. Data acquisition: P Pascua, Francisco E Martín-Cano, MC Camello-Almaraz, E. Vara. Data analysis and interpretation: P Pacua, MJ Pozo. PJ Camello. Statistical expertise: PJ Camello, MC Camello. Approval of the article: Pascua P, Camello-Almaraz C, Camello PJ, Martín-Cano FE, Vara E, Tresguerres JAF, Pozo MJ.

8. Reference List

- (1) Rockwood TH, Church JM, Fleshman JW, Kane RL, Mavrantonis C, Thorson AG, et al. Fecal Incontinence Quality of Life Scale: quality of life instrument for patients with fecal incontinence. *Dis Colon Rectum* 2000 Jan;43(1):9-16.
- (2) Camilleri M, Cowen T, Koch TR. Enteric neurodegeneration in ageing. *Neurogastroenterol Motil* 2008 Mar;20(3):185-96.
- (3) Madsen JL, Graff J. Effects of ageing on gastrointestinal motor function. *Age Ageing* 2004 Mar;33(2):154-9.
- (4) Talley NJ, O'Keefe EA, Zinsmeister AR, Melton LJ, III. Prevalence of gastrointestinal symptoms in the elderly: a population-based study. *Gastroenterology* 1992 Mar;102(3):895-901.
- (5) Kay L. Prevalence, incidence and prognosis of gastrointestinal symptoms in a random sample of an elderly population. *Age Ageing* 1994 Mar;23(2):146-9.
- (6) Grattagliano I, Portincasa P, Cocco T, Moschetta A, Di PM, Palmieri VO, et al. Effect of dietary restriction and N-acetylcysteine supplementation on intestinal mucosa and liver mitochondrial redox status and function in aged rats. *Exp Gerontol* 2004 Sep;39(9):1323-32.
- (7) Braaten B, Madara JL, Donowitz M. Age-related loss of nongoblet crypt cells parallels decreased secretion in rabbit descending colon. *Am J Physiol* 1988 Jul;255(1 Pt 1):G72-G84.
- (8) Peck CJ, Samsuria SD, Harrington AM, King SK, Hutson JM, Southwell BR. Fall in density, but not number of myenteric neurons and circular muscle nerve fibres in guinea-pig colon with ageing. *Neurogastroenterol Motil* 2009 Oct;21(10):1075-e90.
- (9) Bernard CE, Gibbons SJ, Gomez-Pinilla PJ, Lurken MS, Schmalz PF, Roeder JL, et al. Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. *Neurogastroenterol Motil* 2009 Jul;21(7):746-e46.
- (10) Phillips RJ, Pairitz JC, Powley TL. Age-related neuronal loss in the submucosal plexus of the colon of Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging* 2007 Jul;28(7):1124-37.
- (11) Lopes GS, Ferreira AT, Oshiro ME, Vladimirova I, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A, et al. Aging-related changes of intracellular Ca²⁺ stores and contractile response of intestinal smooth muscle. *Exp Gerontol* 2006 Jan;41(1):55-62.
- (12) Bitar KN. Aging and neural control of the GI tract: V. Aging and gastrointestinal smooth muscle: from signal transduction to contractile proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 Jan;284(1):G1-G7.
- (13) Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* 1992 Sep;275(3-6):257-66.
- (14) Li M, Xiao ZQ, Chen ZC, Li JL, Li C, Zhang PF, et al. Proteomic analysis of the aging-related proteins in human normal colon epithelial tissue. *J Biochem Mol Biol* 2007 Jan 31;40(1):72-81.
- (15) Pravda J. Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2005 Apr 28;11(16):2371-84.
- (16) Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* 2010;181:127-51.
- (17) Raikhlil NT, Kvetnoy IM, Tolkachev VN. Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature* 1975 May 22;255(5506):344-5.
- (18) Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1, 57-60. 1993.
Ref Type: Generic
- (19) Hardeland R, Tan DX, Reiter RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost

forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 2009 Sep;47(2):109-26.

(20) Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM. Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radic Biol Med* 2010 May 15;48(10):1286-95.

(21) Gomez-Pinilla PJ, Camello-Almaraz C, Moreno R, Camello PJ, Pozo MJ. Melatonin treatment reverts age-related changes in Guinea pig gallbladder neuromuscular transmission and contractility. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 Nov;319(2):847-56.

(22) Gomez-Pinilla PJ, Morales S, Camello-Almaraz C, Moreno R, Pozo MJ, Camello PJ. Changes in guinea pig gallbladder smooth muscle Ca²⁺ homeostasis by acute acalculous cholecystitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 Jan;290(1):G14-G22.

(23) Gomez-Pinilla PJ, Camello PJ, Pozo MJ. Effects of melatonin on gallbladder neuromuscular function in acute cholecystitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2007 Oct;323(1):138-46.

(24) Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Aging impairs neurogenic contraction in guinea pig urinary bladder: role of oxidative stress and melatonin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007 Aug;293(2):R793-R803.

(25) Gomez-Pinilla PJ, Gomez MF, Hedlund P, Sward K, Hellstrand P, Camello PJ, et al. Effect of melatonin on age associated changes in Guinea pig bladder function. *J Urol* 2007 Apr;177(4):1558-61.

(26) Gomez-Pinilla PJ, Camello PJ, Pozo MJ. Protective effect of melatonin on Ca²⁺ homeostasis and contractility in acute cholecystitis. *J Pineal Res* 2008 Apr;44(3):250-60.

(27) Gomez-Pinilla PJ, Gomez MF, Sward K, Hedlund P, Hellstrand P, Camello PJ, et al. Melatonin restores impaired contractility in aged guinea pig urinary bladder. *J Pineal Res* 2008 May;44(4):416-25.

(28) Ariznavarreta C, Castillo C, Segovia G, Mora F, Azcoitia I, Tresguerres JA. Growth hormone and aging. *Homo* 2003;54(2):132-41.

(29) Castillo C, Cruzado M, Ariznavarreta C, Gil-Loyzaga P, Lahera V, Cachofeiro V, et al. Body composition and vascular effects of growth hormone administration in old female rats. *Exp Gerontol* 2003 Sep;38(9):971-9.

(30) De la FM, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, et al. Changes with ageing in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology* 2004;5(6):389-400.

(31) Forman K, Vara E, Garcia C, Ariznavarreta C, Escames G, Tresguerres JA. Cardiological aging in SAM model: effect of chronic treatment with growth hormone. *Biogerontology* 2010 Jun;11(3):275-86.

(32) Tresguerres JA, Kireev R, Tresguerres AF, Borrás C, Vara E, Ariznavarreta C. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008 Feb;108(3-5):318-26.

(33) Kireev RA, Tresguerres AC, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, et al. Effect of exogenous administration of melatonin and growth hormone on pro-antioxidant functions of the liver in aging male rats. *J Pineal Res* 2007 Jan;42(1):64-70.

(34) Nordlund JJ, Lerner AB. The effects of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 1977 Oct;45(4):768-74.

(35) Bogazzi F, Ultimieri F, Raggi F, Russo D, Vanacore R, Guida C, et al. Growth hormone inhibits apoptosis in human colonic cancer cell lines: antagonistic effects of peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands. *Endocrinology* 2004 Jul;145(7):3353-62.

(36) Bogazzi F, Russo D, Locci MT, Chifenti B, Ultimieri F, Raggi F, et al. Apoptosis is reduced in the colonic mucosa of

patients with acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005 Dec;63(6):683-8.

(37) Bogazzi F, Ultimieri F, Raggi F, Russo D, Lombardi M, Cosci C, et al. Reduced colonic apoptosis in mice overexpressing bovine growth hormone occurs through changes in several kinase pathways. *Growth Horm IGF Res* 2009 Oct;19(5):432-41.

(38) Recknagel RO, Glende EA, Jr. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol* 1984;105:331-7.

(39) Camilleri M, Lee JS, Viramontes B, Bharucha AE, Tangalos EG. Insights into the pathophysiology and mechanisms of constipation, irritable bowel syndrome, and diverticulosis in older people. *J Am Geriatr Soc* 2000 Sep;48(9):1142-50.

(40) Gonzalez A, Sarna SK. Different types of contractions in rat colon and their modulation by oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 Apr;280(4):G546-G554.

(41) van der Vliet A, Tuinstra TJ, Bast A. Modulation of oxidative stress in the gastrointestinal tract and effect on rat intestinal motility. *Biochem Pharmacol* 1989 Sep 1;38(17):2807-18.

(42) Englander EW. Gene expression changes reveal patterns of aging in the rat digestive tract. *Ageing Res Rev* 2005 Nov;4(4):564-78.

(43) Lee HM, Greeley GH, Jr., Englander EW. Age-associated changes in gene expression patterns in the duodenum and colon of rats. *Mech Ageing Dev* 2001 Apr 15;122(4):355-71.

(44) Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA. Effect of melatonin administration on parameters related to oxidative damage in hepatocytes isolated from old Wistar rats. *J Pineal Res* 2005 May;38(4):240-6.

(45) Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Fossati M, Tresguerres JA, Vara E. Effect of S-adenosylmethionine on age-

induced hepatocyte damage in old Wistar rats. *Biogerontology* 2005;6(5):313-23.

(46) Salminen A, Kaarniranta K. NF-kappaB signaling in the aging process. *J Clin Immunol* 2009 Jul;29(4):397-405.

(47) Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002 Oct;2(10):725-34.

(48) Beauparlant P, Kwan I, Bitar R, Chou P, Koromilas AE, Sonenberg N, et al. Disruption of I kappa B alpha regulation by antisense RNA expression leads to malignant transformation. *Oncogene* 1994 Nov;9(11):3189-97.

(49) Higgins KA, Perez JR, Coleman TA, Dorshkind K, McComas WA, Sarmiento UM, et al. Antisense inhibition of the p65 subunit of NF-kappa B blocks tumorigenicity and causes tumor regression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Nov 1;90(21):9901-5.

(50) Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002 Mar;3(3):221-7.

(51) Martin AG, Trama J, Crighton D, Ryan KM, Fearnhead HO. Activation of p73 and induction of Noxa by DNA damage requires NF-kappa B. *Ageing (Albany NY)* 2009 Mar;1(3):335-49.

(52) Ohshima H, Tazawa H, Sylla BS, Sawa T. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. *Mutat Res* 2005 Dec 11;591(1-2):110-22.

(53) Dajee M, Lazarov M, Zhang JY, Cai T, Green CL, Russell AJ, et al. NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature* 2003 Feb 6;421(6923):639-43.

(54) Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, Leeuwenburgh C. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Ann N Y Acad Sci* 2002 Apr;959:93-107.

(55) Pozo MJ, Gomez-Pinilla PJ, Camello-Almaraz C, Martin-Cano FE, Pascua P, Rol MA, et al. Melatonin, a potential therapeutic agent for smooth muscle-related pathological

conditions and aging. *Curr Med Chem* 2010;17(34):4150-65.

(56) Kwon Y, Magnuson BA. Aging alters acute apoptotic response to azoxymethane in the colon of rats. *Exp Gerontol* 2007 Dec;42(12):1154-61.

(57) Bertrand PP, Bertrand RL, Camello PJ, Pozo MJ. Simultaneous measurement of serotonin and melatonin from the intestine of old mice: the effects of daily melatonin supplementation. *J Pineal Res* 2010 Aug;49(1):23-34.

(58) Cuesta S, Kireev R, Forman K, Garcia C, Escames G, Ariznavarreta C, et al. Melatonin improves inflammation processes in liver of senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Exp Gerontol* 2010 Dec;45(12):950-6.

(59) Forman K, Vara E, Garcia C, Kireev R, Cuesta S, Cuna-Castroviejo D, et al. Beneficial effects of melatonin on cardiological alterations in a murine model of accelerated aging. *J Pineal Res* 2010 Oct;49(3):312-20.

(60) Garcia-Macia M, Vega-Naredo I, De Gonzalo-Calvo D, Rodriguez-Gonzalez SM, Camello PJ, Camello-Almaraz C, et al. Melatonin induces neural SOD2 expression independent of the NF-kappaB pathway and improves the mitochondrial population and function in old mice. *J Pineal Res* 2011 Jan;50(1):54-63.

(61) Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, Baixeras E. Growth hormone prevents apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in interleukin-3-dependent Ba/F3 cell line. *Mol Endocrinol* 2000 May;14(5):650-61.

Mitochondrion (Sent for publication)

MITOCHONDRIAL DEPOLARIZATION AND METABOLIC
SHIFT ASSOCIATED TO AGE INDUCED IMPAIRMENT OF
CONTRACTION IN AGED SMOOTH MUSCLE OF MICE
COLON

Franciso E. Martin-Cano, Cristina Camello-Almaraz, Maria J Pozo and Pedro J Camello

Dpt. Physiology, Faculty of Nursing and Occupational Therapy, University of
Extremadura, 10003 Cáceres, Spain

Running title: Mitochondria in aged smooth muscle

Correspondence to:

Dr Pedro J Camello

Dpt. of Physiology

Faculty of Veterinary Sciences and Faculty of Nursing

10003 Cáceres, Spain

pcamello@unex.es

Keywords: Mitchondria, aging, smooth muscle, oligomycin, bethanechol, depolarization, Warburg.

CONTENTS

- 1.- Abstract
- 2.- Introduction
- 3.- Material and methods
 - 3.1.- Animals
 - 3.2.- Tissue preparation
 - 3.3.- Contraction recording of colonic smooth muscle strips
 - 3.4.- Cell isolation
 - 3.5.- $[Ca^{2+}]_i$ determination
 - 3.6. Solutions and drugs
 - 3.7. Quantification and statistics
- 4.- Results
- 5.- Discussion
- 6.- Acknowledgements
- 7.- References

1. Abstract

We have studied the changes induced by aging in smooth muscle of mice and the relation to functional changes in the cells. Isometric contraction of smooth muscle strips and mitochondrial membrane potential of isolated muscle cells were recorded in colon from young (3 month old) or aged (22-24 month old) mice. Application of the ATP synthase inhibitor oligomycin showed that in aged, non stimulated cells most of the mitochondrial areas have active ATP synthase, contrary to young and melatonin-treated cells, which have ATP synthase in the reverse mode. Compared to young, aged cells also displayed an impaired mitochondrial response to stimulation and depolarization of the mitochondrial population; both effects were prevented by melatonin treatment. The age-induced changes in mitochondrial activity were associated to reduction in spontaneous and bethanechol-stimulated contraction, an effect prevented by melatonin. The use of mitochondrial and glycolysis inhibitors (rotenone, oligomycin and 2-deoxyglucose) showed that aging induced a shift from mitochondria to glycolysis as the main energy source for stimulus-induced contraction. Availability of intracellular Ca^{2+} stores was apparently non related to the contractility changes, because its mobilization with caffeine was enhanced in aged cells, and did not share with contraction the effects of mitochondrial inhibitors. In conclusion, we describe a functional association between age-induced mitochondrial depolarization and desensitization, shift from mitochondrial to glycolytic energy supply and impairment of contraction in aged smooth muscle. Most of these changes were prevented by long term treatment with melatonin.

2. Introduction

Aging is a complex process driven by genetic, environmental and cellular factors, and not a simple accumulation of molecular and cellular defects leading to dysfunction of tissues, organs and systems. The actual knowledge points towards a set of signal pathways, or longevity pathways, whose temporal development leads to cellular senescence (1). Several of these age-related longevity signaling systems, such as the PIP3/Akt/mTOR pathway, are physiological regulators of the metabolic pathways before promoting the changes associated to aging (2;3). Although theories based on the progressive accumulation of cellular damage cannot explain the progress of aging (4), this senescent cells display a set of changes which include functional alterations and cellular and chemical defects including genetic and oxidative damage.

It is considered that mitochondrion plays a central role as an effector of the aging process. In addition to the role as energy source, the involvement of mitochondrion in calcium signals, production of reactive species and even cell death (5-7) places this organelle at the center of this research field. Some theories have evolved around mitochondria to explain aging (6;8). The lysosomal-mitochondrial theory of aging (6) proposes that progressive attenuation of mitophagy, the macroautophagic pathway for elimination of damaged mitochondria, results in accumulation of non functional mitochondria which can propagate cellular damage through reactive oxygen species and contamination of healthy mitochondria through the fusion-fission cycles.

Mitochondria are dynamic organelles that undergo transport, fusion and fission events which lead to a strong heterogeneity in morphological (9;10) and functional (9;11) terms. Their basic function as energy powerhouse of the cell involves development of a strong potential across the inner membrane, created by pumping protons outside the internal matrix during the flow of electrons from reducing equivalents coming from metabolism. This mitochondrial potential (Ψ_m) is used by the ATP synthase of the inner membrane to synthesize ATP at the expense of partial dissipation of the proton gradient. During cytosolic Ca^{2+} signals mitochondria import Ca^{2+} ions which, in addition to depolarize the inner membrane, stimulate mitochondrial matrix enzymes to activate ATP synthesis.

Although there are numerous studies detailing the effects of aging on the mitochondrial composition and properties using biochemical methods or isolated mitochondria, reports in *in situ* mitochondria are more limited, especially regarding the heterogeneity of the mitochondrial population of the cell. The aim of this study was to characterize the functional changes of *in situ* mitochondria in aged smooth muscle cells and the functional implications for the contraction and Ca^{2+} mobilization. In addition, we tested the effect of melatonin as a possible candidate for intervention in the aging process.

3. Material and Methods

3.1. Animals

Samples were taken from a total number of 53 ICR-1 (Swiss) mice (males and females) divided in three experimental groups: 3 month old mice (18 animals,

young group), animals killed at 22-24 month old (17 animals, aged group) and aged mice treated with melatonin at $10\text{mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$ (dissolved at drinking water during the dark phase) for a period of 9-11 months (18 animals, melatonin group). All animals were supplied by the animal housing service from the University of Extremadura and all of the experiments were conducted according to the guidelines of Animal Care and Use Committees of the University of Extremadura.

3.2. Tissue preparation

Mice were euthanized by cervical dislocation after anesthesia with isoflurane (Esteve Laboratories, Barcelona, Spain). Whole colon was removed from the mouse and located in dissecting dish coated with Sylgard elastomer and filled with ice-cold Krebs-Henseleit (K-H) solution (for composition, see Solutions and drugs). Using high precision forceps, scissors and small inoxidable metallic pins, colon was placed with the mesenteric border upwards, opened longitudinally and pinned flat with the mucosa facing up. The proximal part was used for contractility experiments and the rest of the colon was used to obtain single cells dispersion.

3.3. Contraction recording of colonic smooth muscle strips

The proximal colon segment was cut following the orientation of the circular muscle in strips (3 by 10mm) that were dissected removing mucosa and submucosa. Then strips were attached to a holder with 5/0 silk thread and placed vertically in a 5-ml organ bath (Panlab, Barcelona, Spain) filled with K-H solution maintained at 37°C and gassed with 95% O_2 -5% CO_2 . Isometric contractions were measured using

force displacement transducers that were interfaced with a computer by a PowerLab 8/30 hardware unit and software (AD Instruments, Colorado Springs, CO). Muscle strips were placed under an initial resting tension equivalent to 0.5g in order to set the muscle at optimum length. The muscle strips were allowed to equilibrate for 60 min, with solution changes every 20 min. Bethanechol, oligomycin, rotenone and 2-deoxyglucose, were added to the organ bath to tested these effects on the contractile response.

3.4. Cell isolation

After the removal of the mucosa and submucosa, the muscular layer was cut and incubated for about 25-35 min at 37°C in enzyme solution (for composition, see Solutions and drugs) supplemented with 1mg mL⁻¹ BSA, 1mg mL⁻¹ papain, and 1mg mL⁻¹ dithioerythritol. The tissue was then transferred to fresh enzyme solution containing 1mg mL⁻¹ BSA, 1mg mL⁻¹ collagenase, and 100 μM CaCl₂ and incubated for 2-4 min at 37°C. After 5 washes with cold enzyme solution, single smooth muscle cells were mechanically dispersed in Na⁺ HEPES (for composition, see Solutions and drugs) using an automatic pipette with fire-polished tip. Cell suspensions were kept in HEPES at 4°C until use, generally within 6 h.

3.5. [Ca²⁺]_i determination

[Ca²⁺]_i was determined by [Ca²⁺]_i was determined by epifluorescence microscopy using the fluorescent ratiometric Ca²⁺ indicator fura-2 AM. Isolated cells were loaded with 2 μM fura-2 AM at room temperature for 12 min. Cells suspension was placed in an experimental chamber sealed with a coverslip treated with poly-D-lysine (0.17 mm thick) and placed on the

stage of an inverted microscope (Eclipse TE2000-S, Nikon). After cell sedimentation, a gravity-fed system was used to perfuse different experimental solutions. Cells were illuminated alternatively at 340 and 380nm by a computer controlled monochromator (Optoscan, Cairn Research) at 0.3–1 cycles/s, and the emitted fluorescence was selected by a 510/40-nm bandpass filter. The emitted fluorescence images were captured with a cooled digital charge-coupled device camera (ORCAII-ER, Hamamatsu Photonics) and recorded using dedicated software (Metafluor, Universal Imaging). The ratio of fluorescence at 340 nm to fluorescence at 380nm (F340/F380) was calculated pixel by pixel and used to indicate the changes in [Ca²⁺]_i. A calibration of the ratio for [Ca²⁺]_i was not performed in view of the many uncertainties related to the binding properties of fura-2 with Ca²⁺ inside of smooth muscle cells.

3.6. Determination of changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

Mitochondrial potential was studied by confocal microscopy using the fluorescent indicator tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) in a dequench mode. When isolated cells were loaded with high concentration of TMRM (10μM, room T^a, 15min), the probes concentrates in the negatively charged mitochondria and become quenched. Mitochondria depolarization resulted in release of the indicator from mitochondria to the cytosol, dequench of the indicator and therefore an overall increase of cytosol fluorescence.

An aliquot of cell suspension was placed in an experimental chamber and placed on the stage of an inverted microscope (Eclipse Ti, Nikon). After cell

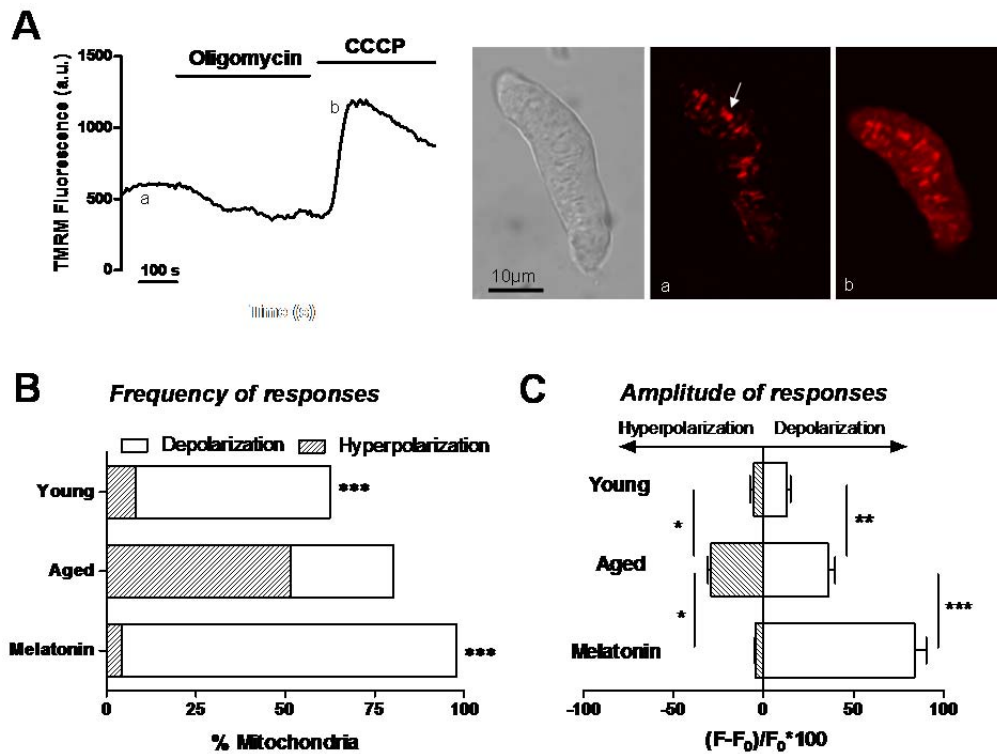


Figure 1 Aging increases the oligomycin-induced hyperpolarization of mitochondrial membrane potential in smooth muscle cells.

(A) Trace representing the hyperpolarization (decrease in TMRM intensity) of a mitochondrial area in the aged cell shown in the bright field and fluorescent images placed at the right side. The final application of CCCP depolarizes the mitochondria and the fluorescence increases while TMRM dequenches before it is dissipated into the cytosol (final decay of the trace) (B) Histogram showing the proportion (%) of mitochondria responding with depolarization and hyperpolarization in young, aged and melatonin-treated cells. (C) Amplitude of changes in mitochondrial membrane potential (% of basal value) in response to oligomycin to block the mitochondrial ATP synthase. $n = 42, 89$ y 96 mitochondria in young, aged and melatonin group respectively. (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)

sedimentation, a gravity-fed system was used to perfuse the chamber with Na⁺-HEPES solution in the absence or presence of experimental agents. Fluorescence images from cells loaded with TMRM were obtained using a laser scanning confocal microscope (Nikon, A1) with 60 oil-immersion objective. TMRM were excited by the 514-nm line of laser, and emission was collected through a 570-620-nm. Once acquired (1 image every 5 s), images were

processed and measured using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

3.7. Solutions and drugs

Composition of Krebs-Henseleit solution (in mM): 113 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, and 11.5 D-glucose (pH 7.35 equilibrated by 95% O₂-5% CO₂). Composition of enzyme solution (in mM): 10 HEPES, 55 NaCl, 5.6 KCl, 80 sodium

glutamate, 2 MgCl₂, and 10 D-glucose (pH 7.3). The Na⁺-HEPES solution contained (in mM) 10 HEPES, 140 NaCl, 4.7 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, and 10 D-glucose (pH 7.3). Drugs and chemicals were obtained from the following sources: bethanechol, caffeine, DTT, rotenone, oligomycin and 2-deoxyglucose from Sigma Chemical (St. Louis, MO); fura-2 AM from Molecular Probes (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands); collagenase from Fluka (Madrid, Spain); papain from Worthington Biochemical (Lakewood, NJ). Other

chemicals used were of analytical grade from Panreac (Barcelona, Spain). Stock solutions of rotenone, oligomycin and fura-2 AM were prepared in DMSO. The solutions were diluted such that the final concentration of DMSO was under 0.1% (vol vol⁻¹).

3.8. Quantification and statistics

Results are expressed as means \pm sem (standard error of the mean) for n mitochondria, cells or colonic strips. Colonic strips tension in response to

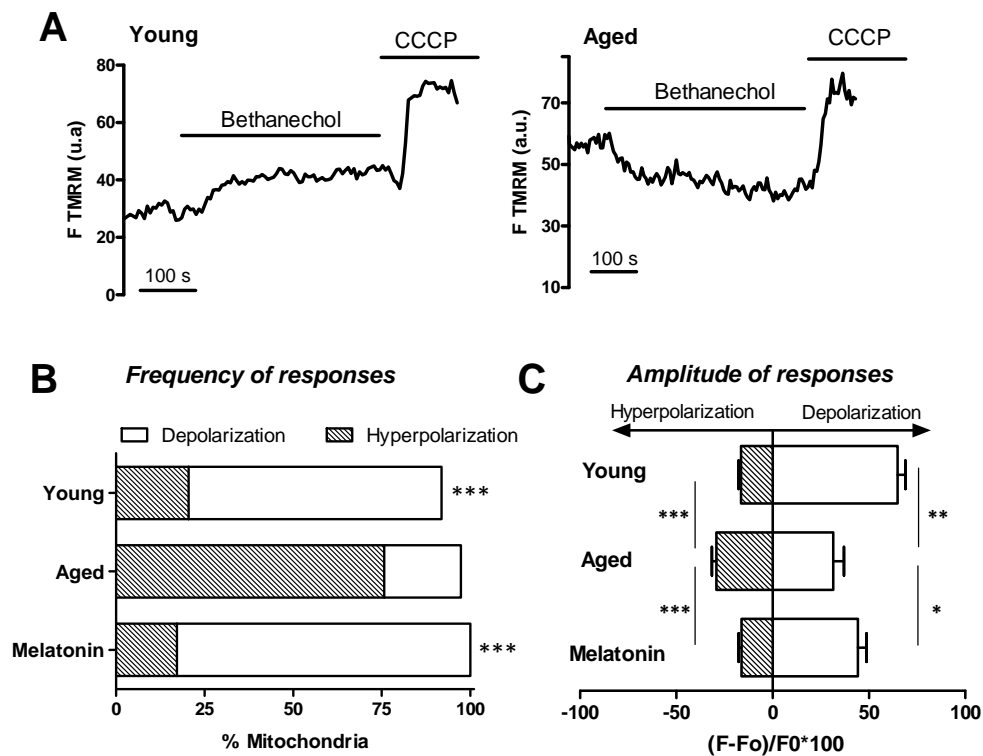


Figure 2 Aging enhances the hyperpolarizing response of mitochondria to bethanechol. **(A)** Typical traces of the depolarization (increase in fluorescence) and hyperpolarization (decrease in fluorescence) of mitochondria in a young (left) and an aged (right) cell challenged with 0.1 mM bethanechol. **(B)** Histogram showing proportion of depolarizing and hyperpolarizing responses to 0.1 mM bethanechol in young, aged and melatonin-treated animals. **(C)** Amplitude changes of the mitochondrial responses in young, aged and melatonin-treated animals. n= 250, 102 and 174 mitochondria in young, aged and melatonin group respectively. (*= p<0.05, **= p< 0.01, ***= p<0.001)

bethanechol and the spontaneous contractile activity, are expressed as area under the curve (AUC, milinewtons*s) for a period of 60 and 300 seconds, respectively. The speed of recovery of Ca^{2+} signals was calculated as the average $(F-F_0)/s$ during the decay phase for each individual cell. Changes in mitochondrial potential are expressed as $(F-F_0)/F_0*100$ where F_0 is resting average fluorescence corresponding to the initial frames previous to perfusion of inhibitors or agonist. Statistical differences between two means were determined by Student's *t*-test. Statistical differences between multiple groups were tested using one way ANOVA. To show significance of inhibition in paired experiments repeated measures ANOVA (figure 5B) or one sample Student's *t* test (hypothetical value =0) (Figure 5C and 6) were used. Fisher's exact *t* test was used to assess significance of differences between proportions (figures 1-3) using the original data, although for the sake of clarity histograms show percentages. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

4. Results

To investigate *in situ* the effects of aging on the status of mitochondrial ATP synthase we studied in single cells the effects of the specific inhibitor oligomycin. ATP synthase uses as energy source the proton gradient across the inner mitochondrial membrane, and therefore induces a slight uncoupling (depolarizing) effect on mitochondrial Ψ_m which can be used as a real time estimate of ATP synthase activity (12): an inhibition of ATP synthase activity hyperpolarizes the mitochondria, and a decrease depolarizes them. In our experiments Ψ_m was estimated using quenching concentrations of the mitochondrial probe TMRM and its

fluorescence increases upon depolarization and decreases during hyperpolarization (13) (see figure 1).

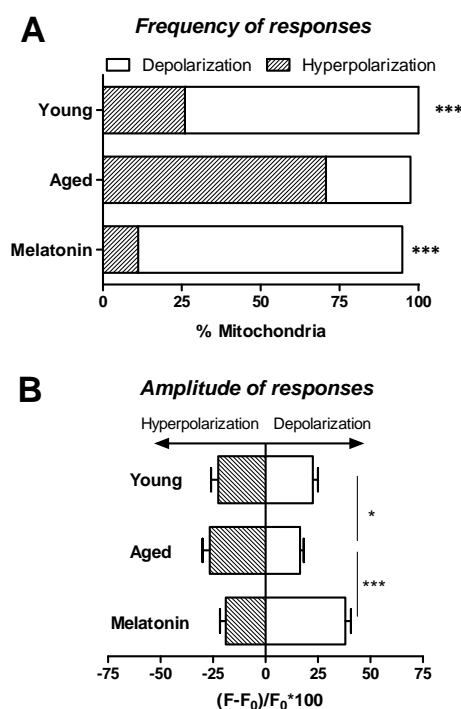


Figure 3 Effects of aging on changes in mitochondrial membrane potential induced by KCl. The histograms shows the percentage (A) of mitochondria responding with depolarization and hyperpolarization to KCl in young, aged and melatonin groups and the average \pm sem amplitude (B) of these responses ($n= 50, 40$ and 93 mitochondria in young, aged and melatonin group respectively) ($*=p<0.05$, $***= p< 0.001$).

Inhibition of ATP synthase with $5 \mu\text{M}$ oligomycin induced a hyperpolarization (indicative of forward mode operating enzyme) in less than 10% of mitochondria of young cells, whereas it depolarized around 50% of mitochondria in aged cells (figure 1). Conversely, the proportion of mitochondria responding with a depolarization, indicative of reverse mode

ATP synthase, was much higher in young (>50%) than in aged cells. This difference in the proportions of hyper- and depolarizing mitochondrial areas was statistically significant (Fischer's exact test, $p < 0.001$). Both the average hyperpolarizing and depolarizing responses were statistically higher ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively) in aged cells. Taken together these results indicate that in resting conditions a high proportion of the mitochondrial network of young cells is operating at reverse mode (using ATP to maintain Ψ_m ; its blockade induces a depolarization) and aging increases the forward ATP synthase activity. Melatonin prevented the effect of aging on the proportion of depolarizing/hyperpolarizing mitochondria, but not the amplitude of depolarization in response to oligomycin.

To investigate the sensitivity of the mitochondrial potential to cell stimulation, we treated TMRM-loaded cells with the muscarinic agonist bethanechol or with a depolarizing solution containing 40 mM KCl. Figure 2 shows that the pattern of frequencies of depolarizing/hyperpolarizing responses (panel 2A) was qualitatively similar to that observed for inhibition of ATP synthase in resting cells but with more extreme values. Thus, young cells responded mainly with a depolarization (about 70%) and aged cells with a hyperpolarization (more than 70% of mitochondria, $p < 0.001$ respect to young), with a lower proportion of mitochondria remaining irresponsive. Aging decreased the average depolarization ($p < 0.01$) and increased ($p < 0.005$) the mean hyperpolarization induced by bethanechol. In these experiments melatonin treatment induced a clear reversion of all the parameters (figure 2). In the case of KCl-

stimulated cells the effects of age were very similar both for the proportions of depolarizing/hyperpolarizing responses and for the size of the average responses: aged cells responded with more frequent (>70% vs 26% in young cells, $p < 0.001$) and slightly bigger hyperpolarizing responses (figure 3B), accompanied by a statistically smaller response for the depolarizing mitochondria. Similar to bethanechol responses, melatonin was also effective preventing these changes

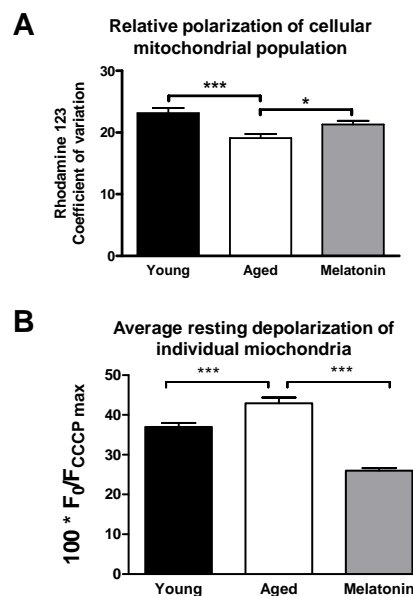


Figure 4 Mitochondrial population show a higher level of depolarization in aged than in young or melatonin-treated cells. (A) Histogram depicting the average \pm sem coefficient of variation of fluorescence of rhodamine 123-loaded cells, directly related to mitochondrial polarization of the cellular mitochondrial network. $n = 51, 68$ and 79 cells from young, aged and melatonin-treated animals. (B) Estimation of basal mitochondrial depolarization using the ratio of the resting (F_0) to full depolarization (CCCP-induced peak fluorescence, $F_{CCCP_{max}}$) fluorescence in TMRM-loaded cells. $n = 278, 130$ and 304 mitochondria from young, aged and melatonin groups respectively. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (A) ANOVA $F = 8.1$, $p < 0.0004$, (B) ANOVA $F = 75.2$, $p < 0.0001$.

in aged animals, increasing both the frequency of depolarizing mitochondria (>80%, $p < 0.001$ respect to aged cells) and the amplitude of the response ($p < 0.001$).

The aforementioned changes induced by aging in the mitochondrial function (figures 1-3) are compatible with age-related depolarization of mitochondria. To investigate this, we compared the polarization status of mitochondria in young and aged cells using the coefficient of variation of the mitochondrial probe rhodamine 123 as an index of the polarization of the mitochondrial population, a previously validated method (14). Figure 4A shows that aged cells showed a slight but

statistically significant ($p < 0.001$) decrease in the coefficient of variation of rhodamine fluorescence, indicative of a decrease in the polarity of the mitochondrial network. However, it could be argued that this method is biased if the morphology of the mitochondrial network is altered in aged cells. To exclude this possibility we compared, in aged and young TMRM-loaded cells, the ratio of resting fluorescence to fully depolarized fluorescence (100 x basal/CCCP-induced peak fluorescence; the lower this ratio the higher the resting polarization) of mitochondrial areas. Panel B of figure 4 shows that the conclusion was similar to that obtained with rhodamine 123 method: aged cells display a more

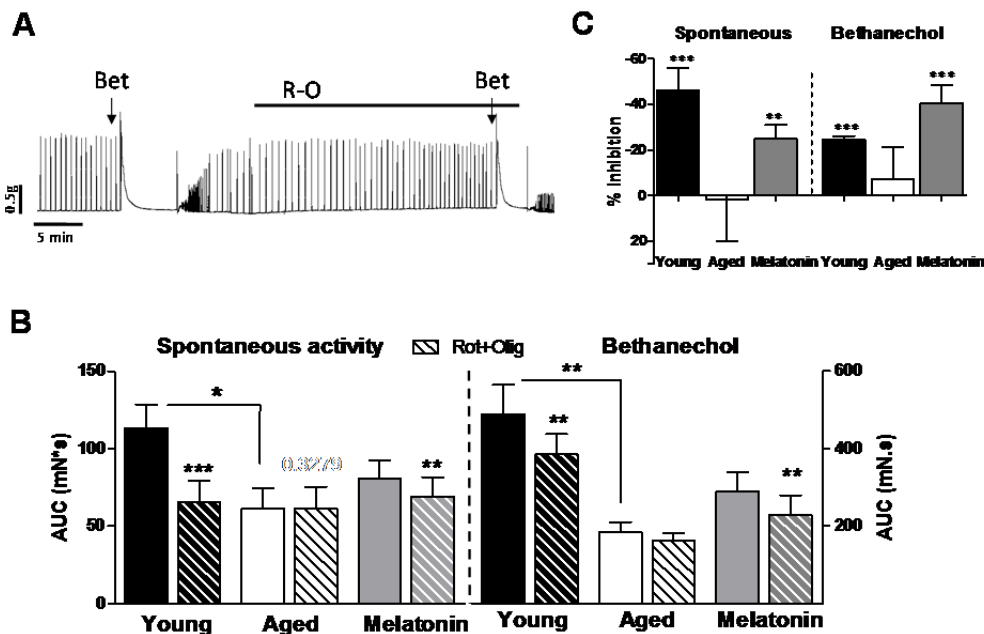


Figure 5 Aging impairs the spontaneous and stimulated contraction and reduces the dependence of contraction on mitochondrial activity. (A) Original trace representing spontaneous and stimulated (Bet, 0.1 mM bethanechol) contraction in a colon smooth muscle strip from a young animal. (B) Histogram shows area under the curve for spontaneous activity and stimulated contraction in absence or presence (Rot+Olig) of 1 μM Rotenone plus 5 μM Oligomycine. Data are mean ± sem. N=10, 8, and 12 strips for adult, aged, and aged treated with melatonin respectively. Asterisks denote significance between paired control/treated groups or as indicated. (C) Histograms depicting the percentage change induced by rotenone plus oligomycine in the spontaneous and stimulated contractility. Asterisks indicate a significant inhibition. (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$)

depolarized mitochondrial population ($p < 0.001$). In both cases melatonin prevented the age-induced partial depolarization of the mitochondria population in smooth muscle colonic cells, increasing significantly the mitochondrial polarity.

To determine whether the changes induced by aging in Ψ_m had functional relevance, we studied the energetic dependence of spontaneous and stimulated contractions on mitochondrial and glycolytic

activities, which can be decreased with specific inhibitors. Strips of the circular layer of mouse colon were studied following the protocol showed in figure 5A. Once stabilized, the non-stimulated activity was recorded for at least 10 min and the strip was then challenged with 0.1 mM bethanechol. After washing out the drug, the strips were allowed to recover its resting activity in absence (control) or presence (treated) of mitochondrial or glycolysis inhibitors. Compared to young mice, both the spontaneous contractions and the

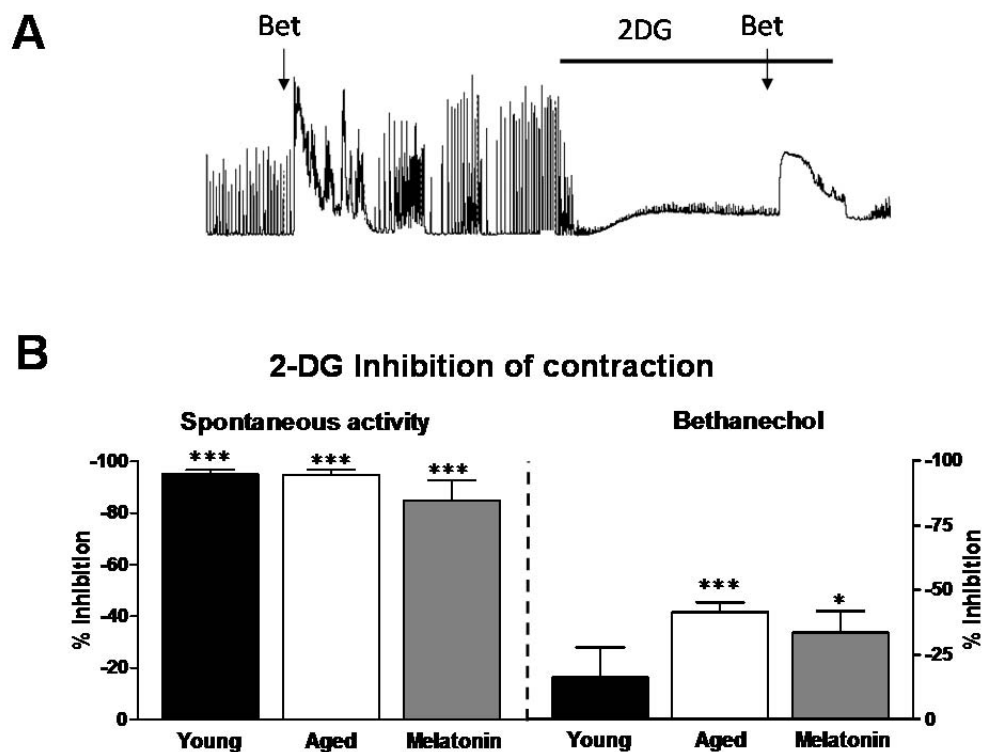


Figure 8. Aging enhanced the Ca^{2+} response to caffeine and increased its dependence on mitochondrial metabolism

(A) Original trace of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in fura-2-loaded isolated colon cells from a young mouse in response to application of two pulses of 10 mM caffeine separated by 20 min to allow for application of drugs. Histograms represent the amplitude (B) of the first response to caffeine and the decay rate (C) of the $[\text{Ca}^{2+}]$ peak for caffeine ($n=35$, 10 and 31 cells for young, aged and melatonin groups). (D) Percentual change of the amplitude of the second response respect to the first one in control (solid bars) and treated (strips bars, rotenone + oligomycin) cells in all the experimental groups. ($n=41$, 10 and 33 treated cells for young, aged and melatonin groups respectively) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

response to 0.1 mM bethanechol were significantly inhibited in aged mice by about 50% (figure 5B).

In order to assess the role of mitochondrial activity as an energy source for contraction, we applied a mixture of 1 μ M rotenone, an inhibitor of the complex I of electron transport chain, plus 5 μ M oligomycin, a specific inhibitor of the ATP synthase of the inner mitochondrial membrane. Figure 5B shows the average values for treated strips paired to their age-matched controls. For the sake of clarity, figure 5C shows percentage of inhibition induced by rotenone plus oligomycin in the three experimental groups. This treatment reduced significantly both the spontaneous ($p < 0.001$) and the stimulated ($p < 0.01$) contraction in young muscle, but was without effect in aged strips.

Melatonin treatment prevented partially the impairment of spontaneous and bethanechol-induced contractions in aged strips, although the contraction in treated animals was not statistically higher than in aged untreated animals. In the case of the effect of mitochondrial inhibition on contraction, melatonin was more effective, restoring clearly the dependence of spontaneous and stimulated contractions respect to mitochondrial activity (as shown by the statistically significant effect of rotenone plus oligomycin in melatonin-treated aged strips –see figure 5B and 5C-).

In order to study the contribution of glycolysis to contraction we repeated the protocol applying a medium substituting 2-deoxyglucose by glucose after the initial control period. As shown in figure 6, this procedure induced a blockade of the spontaneous contraction in all the

experimental groups (young, aged and melatonin-treated animals) (fig 6B, left panel). In the case of bethanechol-induced contraction, glycolysis inhibition had only a small and non significant effect in young animals but caused a clear and statistically significant reduction in aged and melatonin-treated animals (figure 6B, right panel).

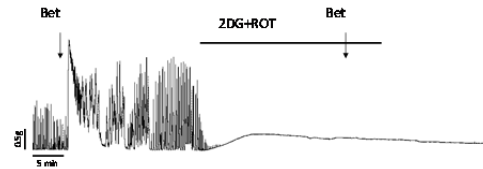


Figure 7 Glycolysis and mitochondria are the only source of energy for contraction in colonic smooth muscle. Representative trace showing the effect of a combination of 2-DG and rotenone in the spontaneous and stimulated (bethanechol, Bet, 0.1 mM) contraction in a young colonic smooth muscle strip. The same behaviour was present in strips from aged and melatonin-treated animals.

Together, these results indicate that the age-induced impairment of both spontaneous and stimulated contractility in colon is associated to a shift from mitochondrial to glycolytic metabolism during stimulated contraction. To rule out the participation of other metabolic routes in the supply of energy for colon contraction, we repeated the protocol using a combination of 2-DG + rotenone in absence of glucose. This procedure effectively blocked both the spontaneous and the bethanechol response in the three experimental groups (figure 7).

Given that aging modifies Ca^{2+} signals, it could be possible that the functional changes described above were related to effects of aging and/or mitochondrial function on mobilization of Ca^{2+} stores, a key factor in the contractility of smooth muscle. We used as agonist

caffeine, a cell permeable agonist of RyR receptors which effectively mobilizes all the agonist-releasable Ca^{2+} pools in colonic smooth muscle cells (15). Figure 8 shows a representative response to caffeine. We determined the effect of age and mitochondrial inhibition on the amplitude of the peak, a direct index of the Ca^{2+} mobilization, and on the recovery rate, an estimate of Ca^{2+} clearing activity. Comparison between young and aged cells revealed that aging enhanced the Ca^{2+} mobilization and decreased the Ca^{2+} clearing activity (figure 8B-C). To assess the effect

of mitochondrial inhibition on the Ca^{2+} signal, a second pulse of caffeine was applied after a 10 min period of treatment with a combination of rotenone + oligomycin. The histograms of figure 8D show that mitochondrial inhibition induced a statistically significant decrease on the Ca^{2+} mobilization that was clearly higher in aged than in young animals. The same pattern was present in the decay velocity, but it did not reach statistical significance. Treatment with melatonin prevented the effects of aging in the Ca^{2+} mobilization (Ca^{2+} peak) and in the sensitivity to mitochondrial

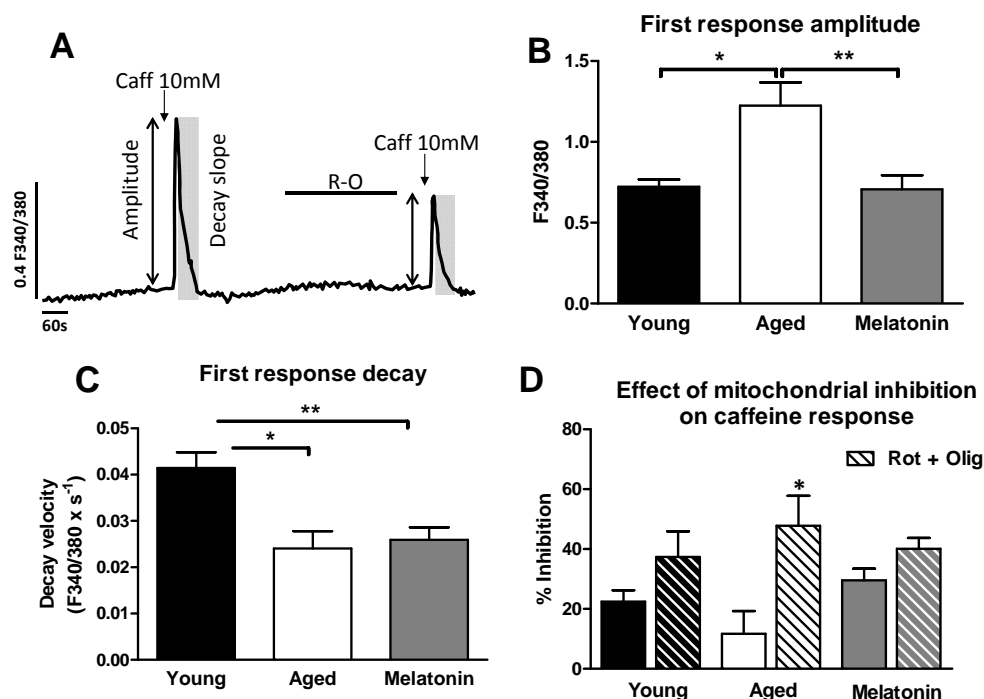


Figure 8. Aging enhanced the Ca^{2+} response to caffeine and increased its dependence on mitochondrial metabolism

(A) Original trace of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in fura-2-loaded isolated colon cells from a young mouse in response to application of two pulses of 10 mM caffeine separated by 20 min to allow for application of drugs. Histograms represent the amplitude (B) of the first response to caffeine and the decay rate (C) of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peak for caffeine (n=35, 10 and 31 cells for young, aged and melatonin groups). (D) Percentual change of the amplitude of the second response respect to the first one in control (solid bars) and treated (strips bars, rotenone + oligomycin) cells in all the experimental groups. (n=41, 10 and 33 treated cells for young, aged and melatonin groups respectively) (*p<0.05, ** p<0.01)

inhibition, but not in the impairment of Ca^{2+} clearing activity observed in aged cells.

5. Discussion

We show in this study that aging of colon smooth muscle cells reduces mitochondrial membrane potential, increases the basal ATP synthase activity and decreases the sensitivity of mitochondrial activity to stimulation. These changes are associated to a shift from mitochondria to glycolysis during contractions, which were also decreased in aged animals.

The alterations of mitochondrial function are considered a key factor in the aging process (9;16;17). Although most of the studies are based on biochemical characterization of the mitochondrial machinery or biophysical analysis of isolated mitochondria, some studies also show that the key functional mitochondrial parameter, Ψ_m , is reduced in aged cells (16;18;19). A previously reported method, validated to perform simple and statistically robust comparison of the membrane potential of mitochondrial populations (19), suffers a caveat: changes in the morphology of aged mitochondria could be a confounding factor in the calculation of the coefficient of variation used in that method. Here, our data using simple TMRM data confirm the previous observations and reinforce the concept of partial depolarization in the mitochondrial population of aged cells (14).

Our study reveals that impairment of contractile function in aged colon is associated to a metabolic shift from mitochondria to glycolysis as the main ATP source during contractile activity. Although

glycolysis is an absolute requirement for spontaneous contraction irrespective of age (figure 7), mitochondria of aged muscle seem clearly desensitized, as suggested by the finding that aging impaired depolarization of mitochondria or blocked the effect of mitochondrial inhibitors during stimulation (figures 2, 3 and 5). This shift has been proposed to play a role as a mechanism to counteract the deleterious effects of senescence by the beneficial effect of an enhanced NADPH production arising from an increased flux of glycolysis (20). The concept that this is a change to lessen the detrimental effects of aging is reinforced by the effect of melatonin. This hormone has proven a clear efficiency to delay the effects and mechanisms of aging, including smooth muscle tissue (for a review see(21)). In our conditions melatonin prevented the effects of aging on resting (figure 1) and stimulated (fig 2-3) mitochondrial potential, contraction (figure 5) and calcium release (figure 8), but it was without effect on the role of glycolysis (figure 2) as would be expected if this were an adaptive response in aged tissue.

The present data suggest that the metabolic shift of aged smooth muscle is likely due, at least in part, to changes in the mitochondrial status. First, in resting condition mitochondria of aged muscle display a higher ATP synthase activity in forward (ATP synthesizing, Ψ_m dissipating) mode compared to young or melatonin-treated muscle. This would be consistent with a mild uncoupling effect to decrease oxidant production, but the “mild uncoupling” hypothesis as a protective mechanism seems seriously dubious in light of recent evidence (e.g. (22)). Other possibility is simply a regulatory failure of

the respiratory chain leading to increased basal activity (figure 1) and lower response to stimulus (figures 2-3). However, this would be in conflict with the enhanced average depolarization induced by melatonin, a known protector of mitochondria (23), which seems to improve all the mitochondrial parameters. Second, a high proportion of aged mitochondria displayed an aberrant hyperpolarizing response to stimulation with bethanechol or KCl, conditions of metabolic demand. Again, this could be due to impairment of the regulatory elements of the respiratory chain, compatible with a higher proportion of aberrant mitochondria in senescent cells due to altered mitophagy (17).

Regarding the effect of aging on the Ca^{2+} signal, our findings show a clear dissociation between contraction and Ca^{2+} release. Thus, the Ca^{2+} release by caffeine was higher and longer in aged than in young cells, and melatonin only prevented the size of the peak. In terms of the sensitivity to mitochondrial inhibitors the pattern was also very different to that observed in contraction or mitochondrial potential. Although we have previously shown that ageing can enhance some $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signals (24), it did in parallel to the resulting contractility. The rationale for the changes in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signal are likely due to aging-induced modifications of signaling elements linked to the Ca^{2+} signal machinery, such as the mTOR/FKBP12 pathway (25) or simply an enhanced expression or activity of RyR receptors, because other explanations seem more unlikely: the size of the stores should be decreased in aged cells in view of the reduced Ca^{2+} clearing capacity of aged colonic cells (figure 8), and could not therefore explain the increased caffeine

response. An intriguing possibility is that the higher activity of ATP synthase in resting aged cells could induce a local ATP increment in the vicinity of the RyR receptors which are positively modulated by ATP (26), but to our knowledge there is no supporting evidence.

Our experimental approach allowed evaluation of the heterogeneity of mitochondrial population of young and aged cells. The finding that, in resting conditions around 50% of mitochondria of young cells are operated in reverse mode (although at low intensity, as judged from the amplitude of the oligomycin-induced hyperpolarization) suggest that upon low energetic demand cells can direct energy to the maintenance of mitochondrial potential. On the contrary, a percentage of the mitochondrial network responded to cell stimulation not with the expected depolarization (due to Ca^{2+} import into the matrix and acceleration of the ATP synthase) but with a hyperpolarization. In other systems hyperpolarizing mitochondria have also been observed in association to Ca^{2+} signals, and has been proposed to be the result of feed-forward acceleration of energy metabolism (27). This is in keeping with the current view that the mitochondrial network presents clear heterogeneity, so that different parts of the population could present different oxidative phosphorylation status (10;11).

6. Acknowledgements

Supported by BFU2011-24365, RETICEF RD12/0043/0016, FEDER and Junta de Extremadura (GR10009).

7. Reference List

- (1) Blagosklonny MV. Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging (Albany NY)* 2012 Mar;4(3):159-65.
- (2) Blagosklonny MV. Aging: ROS or TOR. *Cell Cycle* 2008 Nov 1;7(21):3344-54.
- (3) Budanov AV, Lee JH, Karin M. Stressin' Sestrins take an aging fight. *EMBO Mol Med* 2010 Oct;2(10):388-400.
- (4) Blagosklonny MV. Answering the ultimate question "What is the Proximal Cause of Aging?". *Aging (Albany NY)* 2012 Dec 30.
- (5) Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 Nov;291(5):C1082-C1088.
- (6) Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 2002 Apr;269(8):1996-2002.
- (7) Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 2000 Nov 15;529 Pt 1:57-68.
- (8) de Grey AD. Mitochondria in homeotherm aging: will detailed mechanisms consistent with the evidence now receive attention? *Aging Cell* 2004 Apr;3(2):77.
- (9) Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang JC, Aris JP, Leeuwenburgh C. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci* 2010 Aug 1;123(Pt 15):2533-42.
- (10) Kuznetsov AV, Margreiter R. Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *Int J Mol Sci* 2009 Apr;10(4):1911-29.
- (11) Petersen OH. Specific mitochondrial functions in separate sub-cellular domains of pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch* 2012 Jul;464(1):77-87.
- (12) Nicholls DG, Ward MW. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci* 2000 Apr;23(4):166-74.
- (13) Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 2011 Apr 15;435(2):297-312.
- (14) Xiong J, Camello PJ, Verkhatsky A, Toescu EC. Mitochondrial polarisation status and [Ca²⁺]_i signalling in rat cerebellar granule neurones aged in vitro. *Neurobiol Aging* 2004 Mar;25(3):349-59.
- (15) Flynn ER, Bradley KN, Muir TC, McCarron JG. Functionally separate intracellular Ca²⁺ stores in smooth muscle. *J Biol Chem* 2001 Sep 28;276(39):36411-8.
- (16) Lee S, Jeong SY, Lim WC, Kim S, Park YY, Sun X, et al. Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem* 2007 Aug 3;282(31):22977-83.
- (17) Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 2002 Apr;269(8):1996-2002.
- (18) Camello-Almaraz C, Salido GM, Pariente JA, Camello PJ. Role of mitochondria in Ca²⁺ oscillations and shape of Ca²⁺ signals in pancreatic acinar cells. *Biochem Pharmacol* 2002 Jan 15;63(2):283-92.
- (19) Toescu EC, Verkhatsky A. Assessment of mitochondrial polarization status in living cells based on analysis of the spatial heterogeneity of rhodamine 123 fluorescence staining. *Pflugers Arch* 2000 Oct;440(6):941-7.
- (20) Kondoh H. Cellular life span and the Warburg effect. *Exp Cell Res* 2008 Jun 10;314(9):1923-8.
- (21) Pozo MJ, Gomez-Pinilla PJ, Camello-Almaraz C, Martín-Cano FE, Pascua P, Rol MA, et al. Melatonin, a potential therapeutic agent for smooth muscle-related pathological

conditions and aging. *Curr Med Chem* 2010;17(34):4150-65.

(22) Johnson-Cadwell LI, Jekabsons MB, Wang A, Polster BM, Nicholls DG. 'Mild Uncoupling' does not decrease mitochondrial superoxide levels in cultured cerebellar granule neurons but decreases spare respiratory capacity and increases toxicity to glutamate and oxidative stress. *J Neurochem* 2007 Jun;101(6):1619-31.

(23) Leon J, cuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005 Jan;38(1):1-9.

(24) Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Aging differentially modifies agonist-evoked mouse detrusor contraction and calcium signals. *Age (Dordr)* 2011 Mar 1;33:81-8.

(25) Martin-Cano FE, Camello-Almaraz C, Hernandez D, Pozo MJ, Camello PJ. mTOR pathway and Ca²⁺ stores mobilization in aged smooth muscle cells. *Aging (Albany NY)* 2013 May 8.

(26) Popova OB, Baker MR, Tran TP, Le T, Serysheva II. Identification of ATP-binding regions in the RyR1 Ca(2)(+) release channel. *PLoS One* 2012;7(11):e48725.

(27) Gerencser AA, Chinopoulos C, Birket MJ, Jastroch M, Vitelli C, Nicholls DG, et al. Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J Physiol* 2012 Jun 15;590(Pt 12):2845-71..

Aging (Albany NY). 2013 May 8. [Epub ahead of print]

mTOR PATHWAY AND Ca²⁺ STORES MOBILIZATION IN AGED SMOOTH MUSCLE CELLS

Francisco Eduardo Martín-Cano, Cristina Camello-Almaraz, David Hernandez, Maria J Pozo
and Pedro J Camello.

Department of Physiology, Faculty of Nursing and Faculty of Veterinary Sciences,
University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain.

Running Title: mTOR and Ca²⁺ signal

Correspondence to:

Dr Pedro J Camello
Dpt. of Physiology
Faculty of Veterinary Sciences and Faculty of Nursing
10003 Cáceres, Spain
pcamello@unex.es

Keywords: mTOR, Ca²⁺ signal, FKBP12, colon, smooth muscle.

CONTENTS

- 1.- Abstract
- 2.- Introduction
- 3.- Results
 - 3.1.- Effect of aging on mTOR pathway activation
 - 3.2.- Modification of Ca²⁺ signals in aged smooth muscle cells
- 4.- Discussion
- 5.- Methods
 - 5.1.- Animals and cell isolation
 - 5.2.- Cell loading and [Ca²⁺]_i determination
 - 5.3.- Analysis of protein expression and phosphorylation by Western blot
 - 5.4.- Solutions and drugs
 - 5.5.- Quantification and statistics
- 6.- Acknowledgements
- 7.- References

1. Abstract

Aging is considered to be driven by the so called senescence pathways, especially the mTOR route, although there is almost no information on its activity in aged tissues. Aging also induces Ca^{2+} signal alterations, but information regarding the mechanisms for these changes is almost inexistent. We investigated the possible involvement of the mTOR pathway in the age-dependent changes on Ca^{2+} stores mobilization in colonic smooth muscle cells of young (4 month old) and aged (24 month old) guinea pigs. mTORC1 activity was enhanced in aged smooth muscle, as revealed by phosphorylation of mTOR and its direct substrates S6K1 and 4E-BP1. Mobilization of intracellular Ca^{2+} stores through IP_3R or RyR channels was impaired in aged cells, and it was facilitated by mTOR and by FKBP12, as indicated by the inhibitory effects of KU0063794 (a direct mTOR inhibitor), rapamycin (a FKBP12-mediated mTOR inhibitor) and FK506 (an FKBP12 binding immunosuppressant). Aging suppressed the facilitation of the Ca^{2+} mobilization by FKBP12 but not by mTOR, without changing the total expression of FKBP12 protein. In conclusion, our study shows that in smooth muscle aging enhances the constitutive activity of mTORC1 pathway and impairs Ca^{2+} stores mobilization by suppression of the FKBP12-induced facilitation of Ca^{2+} release.

2. Introduction

Aging can be viewed as a quasi-programmed process driven by changes in signaling pathways, among which the mTOR pathway stands out as a key factor (1;2). This kinase forms part of a energy-sensing signaling pathway and can assemble two types of heteromeres, mTORC1 and

mTORC2, the former involved in aging based on the lifespan-extending effects of the mTOR inhibitor rapamycin (reviewed in (3)). mTORC1 is activated by nutrients, insulin and the $\text{PI}_3\text{K}/\text{Akt}$ pathway, and can be inhibited by nutrients deprivation, AMPK activation (4) and FKBP12 (5;6), the target for the immunosuppressant rapamycin. mTOR has been proposed to convert arrest to senescence (geroconversion) (7;8). In spite of this, there is very little information regarding the mTOR pathway status in aged tissues (9;10).

One of the functional consequences of aging is the alteration of different aspects of calcium signals, which play a key role in multiple cellular functions, from contraction or secretion to gene regulation and cell fate and proliferation. Therefore, these changes are the basis for important alterations linked to aging (11-15). Calcium signals consist of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) increases due either to activation of Ca^{2+} entry from extracellular space (through Ca^{2+} channels activated by voltage, Ca^{2+} stores depletion or receptors), or to Ca^{2+} release from intracellular stores. Mobilization of intracellular stores is mediated by IP_3R and RyR channels, activated respectively by the intracellular messengers IP_3 and cADPribose. The subsequent $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decrease to resting levels is operated by active extrusion to extracellular medium or reuptake into intracellular organelles.

Most of available evidence on the effects of aging on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ has focused on Ca^{2+} clearing mechanisms (15-17) and influx of extracellular Ca^{2+} (15;18;19), but it is rather limited and controversial for Ca^{2+} release. In neurons, the most studied model for age-related changes in Ca^{2+} signals, there is evidence that aging enhances Ca^{2+} release from intracellular stores through RyR and

IP₃R calcium channels (13), similar to reports in cardiomyocytes (20). In aged smooth muscle cells both inhibition (21) and enhancement (22;23) have been reported.

Regarding the mechanisms underlying the effects of age on $[Ca^{2+}]_i$ signals, knowledge is rather superficial, most of the studies addressing only a description of the signal alterations. Some authors have proposed that mitochondrial modifications or redox imbalance are the origin for Ca^{2+} signal dysfunction (14;24). Interactions between some mTOR pathway elements and Ca^{2+} release imply that the mTOR pathway could be involved in the age-related $[Ca^{2+}]_i$ modifications: Ca^{2+} release from intracellular stores can be modulated by mTOR kinase (25-28), and its inhibitor FKBP12 is a known modulator of Ca^{2+} release channels (29). More explicit, a recent study hypothesizes that in aging neurons down-regulation of FKBP12 activates mTOR and enhances RyR mediated Ca^{2+} release (5), explaining the Ca^{2+} signal phenotype typical of aged neurons (12).

The aim of this study was to investigate the involvement of mTOR and FKBP12 in the age-induced changes in Ca^{2+} release in smooth muscle cells. Our data indicate that aging reduces the intracellular Ca^{2+} release, an effect accompanied by loss of a facilitatory effect of FKBP12 on Ca^{2+} mobilization which was independent on the expression of this protein. mTOR facilitated Ca^{2+} release both in young and aged cells and showed enhanced activity in aged cells.

3. Results

3.1. Effect of aging on mTOR pathway activation

Since changes in the mTOR route have been proposed to be associated to the aging process (30), we investigated the constitutive activation of this pathway in the non stimulated smooth muscle layer of guinea pig colon. Activation of mTORC1 can be reliably determined by phosphorylation of Ser 2448 (31). Figure 1 shows that Ser2448 phosphorylation was significantly enhanced in the aged colon muscle layer compared to the young colon ($p < 0.05$). To confirm that mTOR pathway was enhanced in aged muscle, we determined the level of phosphorylation of

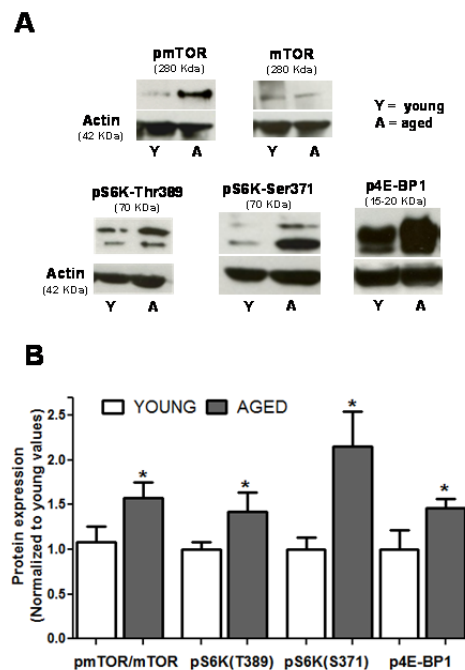


Figure 1. Aging enhances the constitutive activity of the mTOR pathway in colon smooth muscle. (A) Representative immunoblots showing expression of mTOR and phosphorylated (active) forms of mTOR, p70S6K1 (at Thr389 and Ser371) and 4E-BP1 in non stimulated muscular layer of colon. Figures in parenthesis are the molecular weight of each band as judged from the molecular weight marker run in each assay. (B) Histogram depicting phosphorylation of mTOR and its substrates in young and aged colon. Values are average \pm sem of arbitrary units normalized to mean average values of young colon. * $p < 0.05$, $n = 6$.

two direct substrates of mTOR, p70S6K1 and 4E-BP1, which are respectively activated and inhibited upon phosphorylation by mTORC1 kinase activity. We found that aged muscle showed higher levels of the phosphorylated forms of both 4E-BP1 and p70S6K1, the latter including phosphorylation of two different residues specific for mTOR kinase activity (32) (Fig 1).

3.2. Modification of Ca^{2+} signals in aged smooth muscle cells

To study the effects of aging in the mobilization of Ca^{2+} from intracellular stores we challenged colon smooth muscle cells with bethanechol, known to release Ca^{2+} through IP_3R in this cell type (33;34), or with caffeine, which releases Ca^{2+} through RyR (35). $[Ca^{2+}]_i$ signals induced by mobilization of intracellular Ca^{2+} pools in smooth muscle cells are characterized by an initial $[Ca^{2+}]_i$ peak followed by gradual decline towards pre-stimulus levels, as shown in Figure 2. Bethanechol caused a transient $[Ca^{2+}]_i$ increase which was smaller in aged ($0.418 \pm 0.024 \Delta F_{340}/F_{380}$, $n=188$) than in young cells ($0.546 \pm 0.028 \Delta F_{340}/F_{380}$, $n=117$, $p < 0.005$). Compared to bethanechol, the effect of caffeine in young cells was also transient but larger in amplitude ($0.588 \pm 0.027 \Delta F_{340}/F_{380}$, $n=165$, $p < 0.05$), and showed a similar decrease in aged cells ($0.450 \pm 0.018 \Delta F_{340}/F_{380}$, $n=286$, $p < 0.005$).

To assess a possible role of mTOR in Ca^{2+} pools mobilization, we used a double pulse protocol: either bethanechol or caffeine was applied twice separated by a 15 minutes interval to allow for recovery of the response and acute application of inhibitors (see Fig. 3). In control experiments the amplitude of the second stimulus was close to 90 % respect to the first one in young

cells (bethanechol: 85.60 ± 4.82 % respect to the first pulse, $n=54$; caffeine: 88.10 ± 4.16 %, $n=74$), and close to 80% in aged cells (bethanechol: 81.13 ± 3.59 %, $n=89$; caffeine: 74.24 ± 2.87 %, $n=130$) (Fig. 3).

To inhibit mTOR we used two different types of compounds: rapamycin, a frequently used mTOR inhibitor which binds to FKBP12 protein to inhibit mTOR kinase, and KU0063794, a second generation inhibitor acting directly at the kinase domain of mTOR. When applied to cells from young guinea pigs, KU0063794 ($5 \mu M$) significantly decreased ($p < 0.005$) the responses to bethanechol and to caffeine (by around 50% each, see Fig. 3). This inhibition was also present in aged cells, indicating that mTOR kinase activity has a

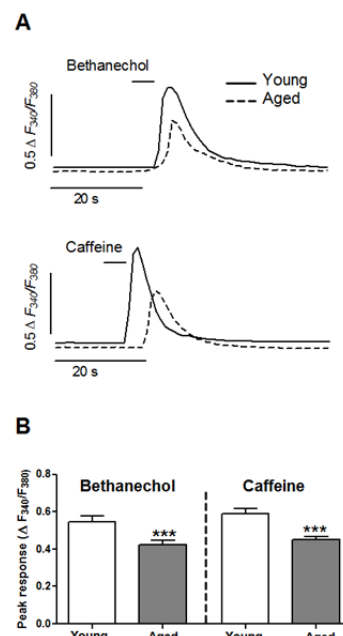


Figure 2. Aging inhibits the mobilization of Ca^{2+} stores in colonic smooth muscle cells. (A) Isolated cells were challenged with a short pulse of bethanechol (0.1 mM) or caffeine (10 mM) to release Ca^{2+} from intracellular pools through IP_3R and RyR channels, respectively. Traces are representative of average responses in young and aged cells. (B) Average \pm sem response ($\Delta F_{340}/F_{380}$) from young (8 animals, 117 and 165 cells) and aged (6 animals, 188 and 286 cells) guinea pigs.

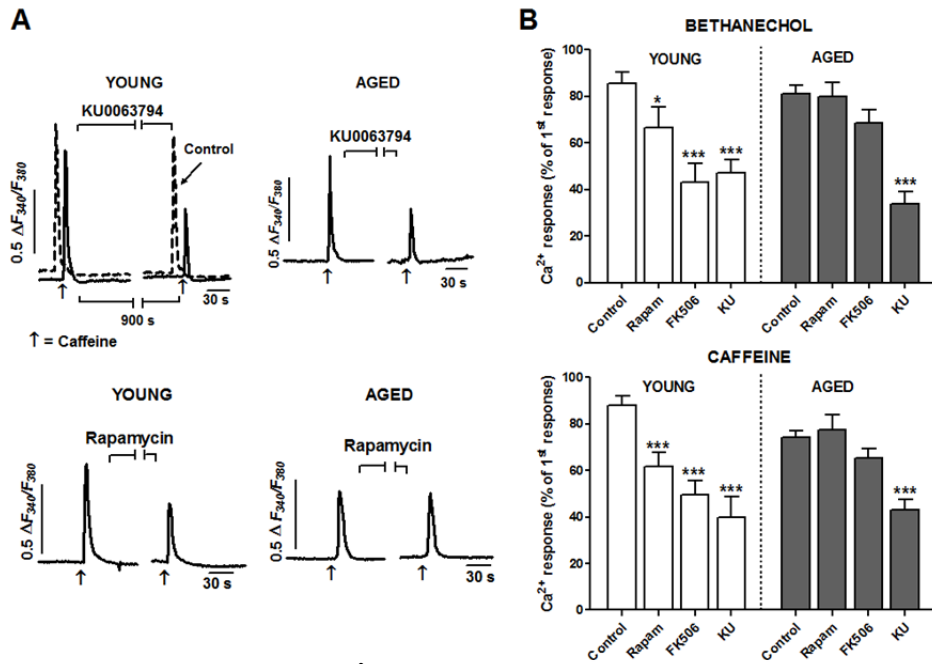


Figure 3 Aging reduces facilitation of Ca^{2+} release by FKBP12 but not by mTOR kinase in smooth muscle cells. (A) Cells were stimulated with two pulses of caffeine (10 mM) separated by a 15 min interval to apply inhibitors (indicated by horizontal lines) or normal medium (control trace). For the sake of comparison, the control trace in top left panel is shifted to the left. Traces are representative of the effects of KU0063794 (5 μ M) or rapamycin (5 μ M) on young (left column) or aged cells (right column). (B) Histogram summarizing the effects of the three inhibitors (KU: KU0063794, 5 μ M; rapamycin 5 μ M; FK506 10 μ M) on the bethanechol (0.1 mM) and caffeine (10 mM) evoked Ca^{2+} responses in young and aged cells. Two-ways ANOVA showed significant effect for treatment (bethanechol: $F = 22.4$, $p < 0.005$; caffeine: $F = 21.9$, $p < 0.005$), which was modified by age (bethanechol: $F = 4.0$, $p < 0.01$; caffeine: $F = 5.0$, $p < 0.01$). Asterisks denote significance for planned comparisons between groups of interest. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$. $n = 17-130$ cells from 6 (aged) or 8 (young) animals.

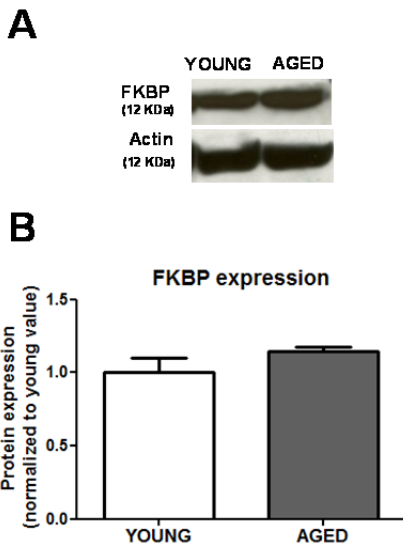


Figure 4 Aging does not change significantly the expression of FKBP12 protein. (A) Representative immunoblots and (B) average \pm sem values (arbitrary units) ($n=6$) of the FKBP12 expression in muscular layer of colon from young and aged guinea pigs.

facilitating role on IP₃R- and RyR-mediated Ca²⁺ release and that this facilitation is not affected by aging. In the case of rapamycin (5 μM), its inhibitory effect in young cells was qualitatively similar to that of KU0063794 though smaller in amplitude (around 23 and 30% for bethanechol and caffeine, respectively; Fig. 3). On the contrary, in aged cells the inhibition was strongly attenuated or even suppressed, suggesting that the mechanisms of action of rapamycin on the Ca²⁺ mobilization are altered in aged cells.

To explore the differential influence of age on KU0063794 and rapamycin effects on Ca²⁺ mobilization, we treated colon muscle cells with the compound FK506, which binds FKBP12 without inhibiting mTOR activity. In young cells FK506 (10 μM) reduced clearly ($p < 0.005$) the

responses to bethanechol and caffeine by approximately 50 and 60% respectively (Fig. 3). Similar to rapamycin, FK506 failed to inhibit significantly the responses in aged cells. Therefore, our data strongly suggest that aging alters the FKBP12-mediated facilitation of calcium signal, but not the facilitation induced by mTOR.

In view of our data, and given that a recent report shows an age-related decrease in FKBP12 expression (5), we explored a possible down-regulation of FKBP12 expression in the colonic smooth muscle layer of aged guinea pigs. Figure 4 shows, however, that in the aged colon there is a slight and non-significant ($p < 0.09$) increase in FKBP12 rather than a decrease in the expression of this protein.

4. Discussion

The present study shows that in colonic smooth muscle aging enhances the activity of the mTOR pathway and inhibits the mobilization of Ca²⁺ stores, an effect

likely associated to the alteration of the facilitating effect of FKBP12 protein on Ca²⁺ mobilization.

Aging is considered a process regulated by longevity pathways among other factors. The mTOR route is an energy-sensing system whose inhibition with rapamycin prolongs lifespan in a number of models, resembling the effect of caloric restriction (3), hitherto the most successful intervention to extend lifespan. We describe here that in resting conditions aged smooth muscle cells show a significant increase in the expression and phosphorylation of mTOR, and in the phosphorylation of its targets p70S6K1 and 4B-EP1. To our knowledge, the only precedent of age-induced mTOR constitutive activity are hippocampal neurons in mice (9) and an enhancement of pS6 phosphorylation in male mice heart compared to females (10). In human heart no effect of age has been reported (36). Our findings are in keeping with a previous report showing increased mTOR pathway responses in senescent cultured cells (30). Data from gene expression studies are conflicting. Rat hippocampus shows enhanced mTOR gene expression ((37), their supplementary data), but recent array studies on the expression of genes linked to the mTOR pathway in blood samples from human cohorts suggest that aging down-regulates this route (38), although this report found no decrease in mTOR gene expression for and Protor1, a protein forming mTOR complexes, was actually up-regulated. Another study in a cohort of long-lived nonagenarians (39) reported that increased longevity was associated to slightly reduced expression of mTOR gene, but the pattern of the gene expression for the mTOR complex proteins was unclear: for mTORC1 complex, protein

Raptor was impaired but PRAS40 was enhanced, and for mTORC2 complexes only Protor2 was enhanced. Whether these discrepancies are due to methodological or to tissue-specific differences (see (9)) is unclear and need further investigation. In any case, our findings support the theory that aging is a quasi-programmed process driven by signaling routes (1): enhanced mTOR levels would drive and accompany aging, so that the more long-lived individuals display lower levels (10;38). As inhibition of mTOR had the same influence in aged and young cells, it is unlikely, however, that our finding of an age-mediated decrease of Ca^{2+} release is due to the activation of mTOR pathway.

Given that Ca^{2+} signals are a key regulator in multiple cellular functions, age-related changes in this parameter are relevant for the aging process (15). For example, age-related changes in Ca^{2+} influx (18;19;40) could reduce Ca^{2+} content of the stores, a condition known to alter several cellular functions (41), and can change gene expression (42;43). Although in striated muscle the effects of aging on Ca^{2+} signals seem to be relatively settled (enhanced Ca^{2+} sparks and impaired Ca^{2+} release upon stimulation; reviewed in (44)), reports in smooth muscle are very limited and somewhat conflicting. Initial contractility studies proposed enhanced release from intracellular stores in colon and arterial strips (22;23) but not in gallbladder (45). Results from $[\text{Ca}^{2+}]_i$ determination in isolated cells showed that aging decreases intracellular Ca^{2+} release in arterial and detrusor muscle cells (21;46) but not in gallbladder cells (18). We report here that in colonic smooth muscle cells aging impairs IP_3 - and RyR -mediated Ca^{2+} release,

suggesting that age influences this signaling system in a tissue-specific way.

At the moment there is very little information regarding the mechanisms causing age-related changes in Ca^{2+} signals. Because its facilitator role in Ca^{2+} release through IP_3 R and RyR channels (25;27-29), modifications of mTOR and FKBP12 function are plausible candidates to mediate the age-induced Ca^{2+} signal changes. While there is no information regarding the mechanism of action of mTOR on Ca^{2+} release, the complex effects of FKBP12 are due to direct interaction with the channels and/or to inhibition of calcineurin, a known regulator of Ca^{2+} release. In fact, we describe here that both IP_3 and RyR signals are impaired by inhibitors targeted to mTOR kinase (KU0063794), to FKBP12 (FK506) or to both (rapamycin, that binds FKBP12 to a regulatory domain of mTOR kinase). Our results agree with a previous work in colon myocytes for IP_3 -mediated signals (28), but are opposite for RyR -mediated signal (35). The discrepancy could be due to differences in the age of the animals (we use 5 months old, more mature than other reports (35)) or to the experimental design (we use single pulses of stimulation instead of choosing cells responding to repetitive stimulation).

The finding that aging does reduce only the effect of the FKBP12-targeted inhibitors rapamycin and FK506, indicates for the first time that aging could impair Ca^{2+} signals by alteration of the facilitation of Ca^{2+} release by FKBP12. On the contrary, the enhanced activity of mTOR and its facilitating effect on the Ca^{2+} signal in aged cells rules out an involvement of mTOR in the impairment of the Ca^{2+} mobilization. Although a recent report in hippocampus (37) describes that age-related Ca^{2+}

deregulation is due to down-regulation of FKBP12, which operates there as an inhibitor of RyR-mediated Ca^{2+} release (5), we found that FKBP12 expression was not decreased in aged cells. Assuming that FKBP12 interaction to mTOR was normal in aged cells one would expect an inhibition of the signal comparable to that of KU0063794, which was not the case. It is therefore likely that aging simply alters the functional association of FKBP12 with Ca^{2+} release channels and even with mTOR activity. The differences in the effects of experimental manipulations of the mTOR pathway could be due to cell-specific changes in the regulation of aging. For example, in aged hypothalamus only some neuronal populations show enhanced mTOR activity in aged rodents (9). The exact link between changes in FKBP12 expression and functional facilitation of Ca^{2+} release, out of the scope of the present study, deserves further investigation and could be related to the constitutive activation of mTOR pathway in aged cells.

In conclusion, this study shows that in smooth muscle the mTOR kinase activity is increased by aging, but although mTOR facilitates Ca^{2+} mobilization, aged cells present lower responses to agonists as the result of the loss of FKBP12-induced facilitation of Ca^{2+} release.

5. Methods

5.1. Animals and cell isolation

Female guinea pigs (Dunkin–Hartley), housed in light (12 h light–dark cycle) and temperature (20°C) controlled conditions and with *ad libitum* access to water and food, were divided into two groups according to age: young adults (5

months old, average weight 1048.3 ± 82.7 g) and aged (28 month old, average weight 912.9 ± 22.6 g). The experiments were performed according to European guidelines for animal research and approved by the Animal Ethics Committees of the University of Extremadura.

Approximately 20 mg of the circular and longitudinal smooth muscle layer of the colon was cut into small pieces and incubated for 35 min at 37°C in enzyme solution (ES, for composition see *Solutions and drugs*) supplemented with 1 mg/mL BSA, 1 mg/mL papain and 1 mg/mL dithioerythritol. The tissue was then transferred to fresh ES containing 1 mg/mL BSA, 1 mg/mL collagenase and 100 μM CaCl_2 and incubated for 10 min at 37°C. After washing with cold ES, single smooth muscle cells were mechanically isolated using a fire-polished pipette. Cell suspensions were kept in ES at 4°C until use, generally within 6 h. Cell viability (90%), as assessed by trypan blue staining was the same in all groups of animals.

5.2. Cell loading and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ determination

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ was determined by epifluorescence microscopy (Eclipse TE2000-S; Nikon, Melville, NY, USA) at room temperature using the ratiometric Ca^{2+} indicator fura-2. Isolated cells were loaded with 4 μM fura 2-AM at room temperature for 15 min. After loading, cells were perfused with Na^+ -HEPES solution in the absence or presence of the experimental agents. Cells were illuminated with a monochromator (Optoscan; Cairn Research, Faversham, UK) at 340–380 nm 1 Hz cycles, and the emitted fluorescence was captured with a digital camera (ORCAII-ERG; Hamamatsu Spain, Barcelona, Spain) and recorded using dedicated software

(Metafluor; Universal Imaging, Molecular Devices, Downingtown, PA, USA). After background subtraction, fluorescence ratio (F340/F380) was calculated pixel by pixel and used to estimate the changes in $[Ca^{2+}]_i$. A calibration of the ratio for $[Ca^{2+}]_i$ was not performed in view of the many uncertainties related to the binding properties of fura 2 with Ca^{2+} inside of smooth muscle cells.

5.3. Analysis of protein expression and phosphorylation by Western blot

Small pieces (~2 mg of dry weight) were quickly frozen, pulverized in liquid nitrogen, extracted in lysis buffer (for composition see *Solutions and drugs*) and then sonicated for 5 s. Lysates were centrifuged at 10000 g for 15 min at 4°C to remove nuclei and intact cells and the protein concentration was measured. Protein extracts (30 µg) were heat-denatured at 95°C for 5 min with DTT, electrophoresed on 7.5% and 15% polyacrylamide-SDS gels and then transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 1 h at room temperature using 10% bovine serum albumin (BSA) and incubated overnight at 4°C with affinity-purified polyclonal antibodies against mTOR, phospho-mTOR (Ser2448), phospho-4E-BP1, phospho-p70 S6 kinase (Ser371 and Thr389) (Cat#9862, Cell Signaling, Boston, MA, USA) and FKBP12 (#PA1-026A, Thermo Scientific, MA, USA).

A mouse anti-actin antibody (A2066, Sigma-Aldrich) was used to control for protein loading and to normalize expression of proteins of interest. After washing, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse (1:10000; Amersham Biosciences, Bucks, UK) or anti-rabbit (1:7000; Santa Cruz Biotechnology)

IgG-horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies.

Bands were visualized using the supersignal west pico chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL, USA), quantified using the software gel-pro analyzer (4.0, Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) and normalized to α -tubulin content. For comparison purposes between young and aged samples, all the α -tubulin-corrected values were normalized to the average of young samples of the same assay.

In mTOR phosphorylation assay, two similar gels were run and one membrane was incubated with the antibody against the total protein and the other with an antiphospho-protein of interest.

5.4. Solutions and drugs

Na^+ -HEPES solution (in mM): 10 HEPES, 140 NaCl, 4.7 KCl, 2 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$ and 10 D-glucose (pH 7.3). The Ca^{2+} -free Na^+ -HEPES solution included EGTA (1 mM) instead of $CaCl_2$. ES (in mM): 10 HEPES, 55 NaCl, 5.6 KCl, 80 sodium glutamate, 2 $MgCl_2$ and 10 D-glucose (pH 7.3). Lysis buffer (in mM): Tris-HCl 40, NaCl 400, 0.2% SDS and 10% glycerol supplemented with protease and phosphatase inhibitors (4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, E-64, bestatin, leupeptin, aprotinin and sodium vanadate).

Drugs and chemicals were obtained from the following sources: bethanechol, caffeine and phosphatase inhibitors from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain); fura 2-AM from Molecular Probes (Life Technologies, Madrid, Spain), rapamycin and KU-63794 from Calbiochem (VWR, Madrid, Spain), FK-506 from Cayman (VWR, Madrid, Spain), collagenase from Fluka (Madrid,

Spain) and papain from Worthington Biochemical (Lakewood, NJ, USA).

5.5. Quantification and statistics

Results are expressed as means \pm standard error of the mean (sem) of n cells or blots. $[Ca^{2+}]_i$ responses are expressed as increases in the ratio of fura-2 fluorescence ($\Delta F_{340}/F_{380}$). To compare two groups, paired t test was used to assess the effect of treatment. The effects of age and experimental treatments were tested using a two-way analysis of variance, followed by planned comparisons between selected groups. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

6. Acknowledgements

Supported by BFU2011-24365, RETICEF RD06/0013/1012, FEDER and Junta de Extremadura (GR10009).

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflicts of interest.

7. Reference List

- (1) Blagosklonny MV. Answering the ultimate question "What is the Proximal Cause of Aging?". *Aging (Albany NY)* 2012 Dec 30.
- (2) Blagosklonny MV. Aging: ROS or TOR. *Cell Cycle* 2008 Nov 1;7(21):3344-54.
- (3) Camello PJ, Camello-Almaraz C, Pozo MJ. Pharmacological approaches to improve ageing. In: Gallelli L, editor. *Pharmacology*. InTech; 2012. p. 257-82.
- (4) Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2009 Oct 15;122(Pt 20):3589-94.
- (5) Gant JC, Chen KC, Norris CM, Kadish I, Thibault O, Blalock EM, et al. Disrupting function of FK506-binding protein 1b/12.6 induces the Ca^{2+} -dysregulation aging phenotype in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2011 Feb 2;31(5):1693-703.
- (6) Hoeffler CA, Tang W, Wong H, Santillan A, Patterson RJ, Martinez LA, et al. Removal of FKBP12 enhances mTOR-Raptor interactions, LTP, memory, and perseverative/repetitive behavior. *Neuron* 2008 Dec 10;60(5):832-45.
- (7) Leontieva OV, Blagosklonny MV. DNA damaging agents and p53 do not cause senescence in quiescent cells, while consecutive re-activation of mTOR is associated with conversion to senescence. *Aging (Albany NY)* 2010 Dec;2(12):924-35.
- (8) Blagosklonny MV. Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging (Albany NY)* 2012 Mar;4(3):159-65.
- (9) Yang SB, Tien AC, Boddupalli G, Xu AW, Jan YN, Jan LY. Rapamycin ameliorates age-dependent obesity associated with increased mTOR signaling in hypothalamic POMC neurons. *Neuron* 2012 Aug 9;75(3):425-36.
- (10) Leontieva OV, Paszkiewicz GM, Blagosklonny MV. Mechanistic or mammalian target of rapamycin (mTOR) may determine robustness in young male mice at the cost of accelerated aging. *Aging (Albany NY)* 2012 Dec;4(12):899-916.
- (11) Toescu EC, Verkhatsky A. Parameters of calcium homeostasis in normal neuronal ageing. *J Anat* 2000 Nov;197 Pt 4:563-9.
- (12) Gant JC, Sama MM, Landfield PW, Thibault O. Early and simultaneous emergence of multiple hippocampal biomarkers of aging is mediated by Ca^{2+} -

induced Ca²⁺ release. *J Neurosci* 2006 Mar 29;26(13):3482-90.

(13) Thibault O, Gant JC, Landfield PW. Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. *Aging Cell* 2007 Jun;6(3):307-17.

(14) Toescu EC, Verkhratsky A. Ca²⁺ and mitochondria as substrates for deficits in synaptic plasticity in normal brain ageing. *J Cell Mol Med* 2004 Apr;8(2):181-90.

(15) Toescu EC, Vreugdenhil M. Calcium and normal brain ageing. *Cell Calcium* 2010 Feb;47(2):158-64.

(16) Martinez-Serrano A, Blanco P, Satrustegui J. Calcium binding to the cytosol and calcium extrusion mechanisms in intact synaptosomes and their alterations with aging. *J Biol Chem* 1992 Mar 5;267(7):4672-9.

(17) Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Baba A, Matsuda T, Camello PJ. Ca²⁺ extrusion in aged smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 2007 Sep 15;74(6):860-9.

(18) Gomez-Pinilla PJ, Camello-Almaraz C, Moreno R, Camello PJ, Pozo MJ. Melatonin treatment reverts age-related changes in Guinea pig gallbladder neuromuscular transmission and contractility. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 Nov;319(2):847-56.

(19) Xiong Z, Sperelakis N, Noffsinger A, Fenoglio-Preiser C. Changes in calcium channel current densities in rat colonic smooth muscle cells during development and aging. *Am J Physiol* 1993 Sep;265(3 Pt 1):C617-C625.

(20) Howlett SE, Grandy SA, Ferrier GR. Calcium spark properties in ventricular myocytes are altered in aged mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 Apr;290(4):H1566-H1574.

(21) Del CC, Ostrovskaya O, McAllister CE, Murray K, Hatton WJ, Gurney AM, et al. Effects of aging on Ca²⁺ signaling in murine mesenteric arterial smooth muscle cells. *Mech Ageing Dev* 2006 Apr;127(4):315-23.

(22) Rubio C, Moreno A, Briones A, Ivorra MD, D'Ocon P, Vila E. Alterations by age of calcium handling in rat resistance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002 Dec;40(6):832-40.

(23) Lopes GS, Ferreira AT, Oshiro ME, Vladimirova I, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A, et al. Aging-related changes of intracellular Ca²⁺ stores and contractile response of intestinal smooth muscle. *Exp Gerontol* 2006 Jan;41(1):55-62.

(24) Xiong J, Camello PJ, Verkhratsky A, Toescu EC. Mitochondrial polarisation status and [Ca²⁺]_i signalling in rat cerebellar granule neurones aged in vitro. *Neurobiol Aging* 2004 Mar;25(3):349-59.

(25) Fregeau MO, Regimbald-Dumas Y, Guillemette G. Positive regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by mammalian target of rapamycin (mTOR) in RINm5F cells. *J Cell Biochem* 2011 Feb;112(2):723-33.

(26) Dargan SL, Lea EJ, Dawson AP. Modulation of type-1 Ins(1,4,5)P₃ receptor channels by the FK506-binding protein, FKBP12. *Biochem J* 2002 Jan 15;361(Pt 2):401-7.

(27) Macmillan D, McCarron JG. Regulation by FK506 and rapamycin of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle: the role of FK506 binding proteins and mTOR. *Br J Pharmacol* 2009 Oct;158(4):1112-20.

(28) Macmillan D, Currie S, Bradley KN, Muir TC, McCarron JG. In smooth muscle, FK506-binding protein modulates IP₃ receptor-evoked Ca²⁺ release by mTOR and calcineurin. *J Cell Sci* 2005 Dec 1;118(Pt 23):5443-51.

(29) Macmillan D. FK506 binding proteins: Cellular regulators of intracellular Ca(2+) signalling. *Eur J Pharmacol* 2013 Jan 30;700(1-3):181-93.

(30) Chen Y, Wang J, Cai J, Sternberg P. Altered mTOR signaling in senescent retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010 Oct;51(10):5314-9.

- (31) Copp J, Manning G, Hunter T. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res* 2009 Mar 1;69(5):1821-7.
- (32) Saitoh M, Pullen N, Brennan P, Cantrell D, Dennis PB, Thomas G. Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J Biol Chem* 2002 May 31;277(22):20104-12.
- (33) Macmillan D, Chalmers S, Muir TC, McCarron JG. IP3-mediated Ca²⁺ increases do not involve the ryanodine receptor, but ryanodine receptor antagonists reduce IP3-mediated Ca²⁺ increases in guinea-pig colonic smooth muscle cells. *J Physiol* 2005 Dec 1;569(Pt 2):533-44.
- (34) Zhang LB, Buxton IL. Muscarinic receptors in canine colonic circular smooth muscle. II. Signal transduction pathways. *Mol Pharmacol* 1991 Dec;40(6):952-9.
- (35) Macmillan D, Currie S, McCarron JG. FK506-binding protein (FKBP12) regulates ryanodine receptor-evoked Ca²⁺ release in colonic but not aortic smooth muscle. *Cell Calcium* 2008 Jun;43(6):539-49.
- (36) Niemann B, Pan R, Teschner M, Boening A, Silber RE, Rohrbach S. Age and obesity-associated changes in the expression and activation of components of the AMPK signaling pathway in human right atrial tissue. *Exp Gerontol* 2013 Jan;48(1):55-63.
- (37) Kadish I, Thibault O, Blalock EM, Chen KC, Gant JC, Porter NM, et al. Hippocampal and cognitive aging across the lifespan: a bioenergetic shift precedes and increased cholesterol trafficking parallels memory impairment. *J Neurosci* 2009 Feb 11;29(6):1805-16.
- (38) Harries LW, Fellows AD, Pilling LC, Hernandez D, Singleton A, Bandinelli S, et al. Advancing age is associated with gene expression changes resembling mTOR inhibition: evidence from two human populations. *Mech Ageing Dev* 2012 Aug;133(8):556-62.
- (39) Passtoors WM, Beekman M, Deelen J, van der BR, Maier AB, Guigas B, et al. Gene expression analysis of mTOR pathway: association with human longevity. *Aging Cell* 2013 Feb;12(1):24-31.
- (40) Xiong Z, Sperelakis N, Noffsinger A, Fenoglio-Preiser C. Ca²⁺ currents in human colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995 Sep;269(3 Pt 1):G378-G385.
- (41) Mekahli D, Bultynck G, Parys JB, De SH, Missiaen L. Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011 Jun;3(6).
- (42) Kuribara M, Eijssink VD, Roubos EW, Jenks BG, Scheenen WJ. BDNF stimulates Ca²⁺ oscillation frequency in melanotrope cells of *Xenopus laevis*: contribution of IP3-receptor-mediated release of intracellular Ca²⁺ to gene expression. *Gen Comp Endocrinol* 2010 Nov 1;169(2):123-9.
- (43) Morales S, Diez A, Puyet A, Camello P, Camello-Almaraz C, Bautista J, et al. CALCIUM CONTROLS SMOOTH MUSCLE TRPC GENE TRANSCRIPTION VIA THE CAMK/CALCINEURIN-DEPENDENT PATHWAYS. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 Sep 6.
- (44) Weisleder N, Ma J. Altered Ca²⁺ sparks in aging skeletal and cardiac muscle. *Ageing Res Rev* 2008 Jul;7(3):177-88.
- (45) Ishizuka J, Murakami M, Nichols GA, Cooper CW, Greeley GH, Jr., Thompson JC. Age-related changes in gallbladder contractility and cytoplasmic Ca²⁺ concentration in the guinea pig. *Am J Physiol* 1993 Apr;264(4 Pt 1):G624-G629.
- (46) Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Aging differentially modifies agonist-evoked mouse detrusor contraction and calcium signals. *Age (Dordr)* 2011 Mar 1;33:81-8.

Frontiers in neuroscience (Sent for publication)

ENTERIC NEURONAL FUNCTION AND COLONIC MOTILITY IN PINK1^{-/-} MICE, A MODEL FOR PARKINSON'S DISEASE

Francisco Eduardo Martín-Cano¹, Marjan Dondéyne², Werend Boesmans², Vanessa Morais³, Bart De Strooper³, Maria Jose Pozo¹, Pieter Vanden Berghe².

¹ Department of physiology. University of Extremadura. Cáceres. Spain.

² Laboratory for Enteric Neuroscience (LENS), Translational Research Center for Gastrointestinal Disorders (TARGID).

³ Laboratory for the Research of Neurodegenerative Diseases, University of Leuven, Belgium.

Running title: Colonic function in PINK1^{-/-} mice

Correspondence to:

Dr. Pieter Vanden Berghe.

Translational Research in GastroIntestinal Disorders

O&N I Herestraat 49 - box 701

3000 Leuven

Email: Pieter.VandenBerghe@med.kuleuven.be

Keywords: Parkinson's disease, PINK1, mouse model, colonic function, propulsion, enteric nervous system, mitochondria, calcium signaling.

CONTENTS

- 1.- Abstract
- 2.- Introduction
- 3.- Material and methods
 - 3.1.- Animals
 - 3.2.- Video imaging of colonic motility
 - 3.3.- Immunohistochemistry
 - 3.4.- Ca²⁺ imaging in varicosities
 - 3.5.- Data analysis
- 4.- Results
 - 4.1.- Phenotypic characteristics
 - 4.2.- Chemical coding of the ENS
 - 4.3.- Calcium imaging at enteric varicosities
- 5.- Discussion
- 6.- Acknowledgements
- 7.- References

1. Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder. The appearance of the disease is clearly related to aging, although some early onset presentations have been described. These specific variants of Parkinsonism are genetically determined by mutations in different loci, affecting diverse cellular mechanisms with special relevance in the mitochondrial metabolism. Loss of function mutations in the PINK1 gene leads to an increase in the number of altered mitochondria, which could be a source of apoptotic factors that induce neurodegeneration. This neurodegeneration affects dopaminergic neurons from substantia nigra in the CNS, but also alterations in the ENS have been reported accompanied by constipation symptoms. The study of these frequent GI symptoms could lead to new early-diagnosis approaches in PD, supporting the study of the GI physiology in animal models of this disease. In this paper we characterize fundamental aspects of colonic physiology in a PINK1 *-/-* model of PD, using 24 mice of 14 months of age. Sptatiotemporal mapping of colonic propulsive activity, immunohistochemistry of the ENS and calcium imaging in nerve varicosities were performed for the study. The results obtained were as follows: No differences in external morphology or length were detected. Similarly, the colonic propulsion of artificial pellets did not change in the mutant mice. Regarding ENS, the total neuron counting was higher in mutant mice, but no changes in the different neuronal subpopulations or in the glial cells were detected. Calcium homeostasis in varicosities is altered by this mutation, leading to smaller calcium responses to

depolarization and slower extrusion rates. In conclusion, subtle changes occur in the colon from these mice, but they do not translate into alterations in the propulsive activity or external morphology of the colon.

2. Introduction

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative disorders, presenting prevalence around 0.3% of the population in the industrialized countries. The mean age of the onset is 60 years, with a life expectancy of about 15 years from the diagnosis of the disease (1). When looking at the rising prevalence observed in the population over 60 (1%) and population over 80 years of age (4%), the relationship between PD and age is clearly revealed (2). However, 10% of PD patients are younger than 45 years, being classified as early onset PD (3). Little is known about the primary causes that leads to the neurodegeneration observed in PD, but specially these early onset forms of parkinsonism seems to be related with loss-of-function mutations in some specific genes (Parkin, DJ-1, PINK 1, POLG, FBXO2, ATP13A2) (3;4).

Neuropathological diagnosis of PD consists in the observation of marked dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra pars compacta (SNc) and the presence of Lewy bodies, eosinophilic inclusions surrounded by unfolded α -synuclein filaments (4). Despite SNc is the mainly affected region, these findings are not restricted to this specific area, but also affect many other neuronal populations in the brain and even the peripheral nervous system (5). Enteric nervous system (ENS) represents the largest neuronal organization after the central nervous system (CNS), and is also

affected in patients with PD. These individuals display Lewy pathology in their neuronal bodies from myenteric and submucosal plexus, and more interestingly, the burden of Lewy pathology is correlated with the severity of constipation, a common symptom of PD (6-8). The changes observed in the ENS are in line with the theory proposed by Braak and colleagues about the origin of PD. That theory postulates an enteric origin for PD followed by a migration to the CNS through the vagus nerve (9;10).

Either in sporadic or familiar forms of PD, mitochondrial dysfunction plays an important role in the pathogenesis of the disease (11;12). Specifically, loss-of-function mutations in the PINK1 gene are considered the cause of autosomal recessive early-onset PARK6-linked parkinsonism (13). PINK1 is a serine/threonine kinase with an N-terminal mitochondrial targeting sequence. Recent studies suggest that PINK1 recruits Parkin, an E3 ubiquitin ligase, triggering Parkin-mediated mitophagy of depolarized mitochondria (14-16). Loss of functionality in PINK1 may lead to an increase in the number of altered mitochondria, which could be a possible source of oxidative stress and apoptotic-inducing factors. Moreover, PINK1 is also directly involved in the maintenance of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) through an effect on respiratory chain activity (17;18).

Developing and characterizing animal models of PD represents a valuable tool in order to approach to the origin and pathogenesis of this disease. In this paper, we characterize the colonic motility and the calcium homeostasis of enteric neuronal varicosities from PINK1 *-/-* mice.

3. Material and Methods

3.1. Animals

A total number of 24 mice were used in this study, 13 PINK1 *-/-* and 11 age-matched WT mice (\pm 14 weeks old). The generation of these mice was carried out by the group of Vanessa Morais as described in (19). All the experimental procedures performed with these animals were approved by the bioethics committee of K.U. Leuven.

3.2. Video imaging of colonic motility

The large intestine was suspended in an organ bath (Fig. 1A) (\pm 30 minutes post euthanasia) filled with Krebs-solution (in mM: 120.9 NaCl, 5.9 KCl, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 14.4 NaHCO₃, 11.5 Glucose) kept at 37 °C and continuously bubbled with 95 % O₂ / 5 % CO₂ (pH 7.4). Intestines were allowed to equilibrate for 30 minutes, after which an artificial pellet was introduced at the oral end. The propulsion movement was recorded by a video camera at 2Hz for 500s and the resultant files were analyzed to create spatiotemporal maps (ST maps) of the propulsive event. In this analysis, carried out in custom routines based on Igor Pro 6.22 software, the bowel's edges were determined frame by frame, generating a silhouette that was later measured. The width of this silhouette encoded by grayscale and mapped over time, is the information showed in the ST maps. At last, the frequency of the propulsive events and the propulsion distance were determined.

3.3. Immunohistochemistry

Tissues were dissected peeling mucosal and submucosal layers and later on fixed in ice-cold Krebs solution containing

4% paraformaldehyde for 30 minutes and shaking. After fixation, tissues were rinsed and processed for immunohistochemistry using antibodies directed against nitric oxide synthase (nNOS), HuD/C (Neuronal body marker), glial fibrillary acid protein (GFAP), neurofilament 200 (NF200) and Tyrosine Hydroxylase (TH). Most tissues were triple stained using AMCA, Alexa488 and Alexa594 labeled secondary antibodies (More detailed data from antibodies is shown in Table 1). The process consists in a first blocking/permeabilization step on which the tissue was included for 2 hours in a PBS solution containing 5% donkey serum, 5% goat serum and 0.5% triton X-100 (Blocking solution). After that the samples were transferred to a vial containing blocking solution plus the primary antibodies at concentrations described in table 1 and kept at 4°C overnight shaking. After washing, incubation with secondary antibodies last for two hours at room temperature and shaking. The samples were then washed again, mounted in coverslips using anti-fading medium Citifluor (Citifluor Ltd.) and observed under an Olympus BX51 upright microscope. Images were taken at 20x with an Olympus XM10 camera attached to a personal computer running Olympus imaging software.

Antigen	Host	Source	Dilution
HuD/C	Mouse	Invitrogen. Ref: A21271	1/1000
nNOS	Rabbit	Santa Cruz. Ref: sc-648	1/400
TH	Rabbit	Gift	1/1000
NF200	Chicken	Abcam. Ref: Ab 72996-100	1/500
GFAP	Chicken	Abcam. Ref: Ab 7674	1/1000

Table 1: Primary antibodies used in this study

3.4. Ca²⁺-imaging in varicosities

The Ca²⁺-imaging experiments were performed on colonic myenteric plexus. The colon was removed and pinned out in a Sylgard-lined Petri dish containing cold Krebs-solution (continuously bubbled with 95% O₂ / 5% CO₂; pH 7.4). After removing the mucosa, submucosa and longitudinal muscle, tissue samples (± 1 cm²) were attached over a small inox ring, immobilized by a matched rubber O-ring and subsequently loaded with 1µM Fluo-4 AM (Molecular Probes, Invitrogen) and cremophor EL (0.01%, Fluka) at RT, 30 minutes.

Experiments were done in a constant flow of Krebs solution (1ml/min) containing nifedipine (1 µM). A focal Pt electrode (tip 50 µm diameter) was placed on one of the fiberstrands to stimulate either with 1 electrical pulse or 1s at 20Hz. Finally, a supramaximal stimulus consisting of 5 seconds exposure to a high K⁺-solution (75 mM) was applied. Images were recorded using a Zeiss Examiner upright microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with

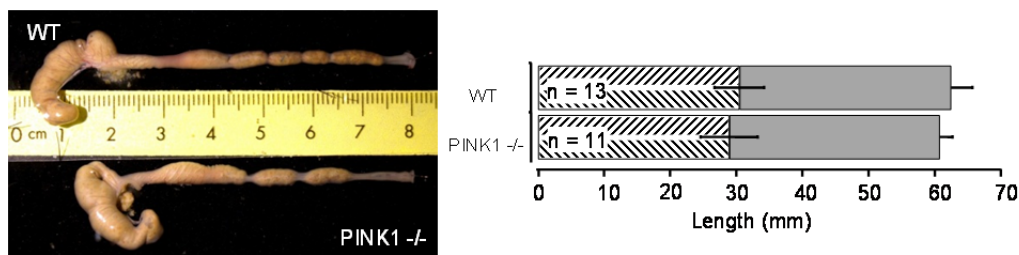


Figure 1: Length and macroscopic appearance of the intestines did not reveal differences between WT and PINK1^{-/-} mice. *Left*: picture of the WT and PINK1^{-/-} colon. *Right*: average length of the proximal (white & strips) and distal colon (grey) in WT (top) and PINK1^{-/-} (bottom) mice.

TILL Poly V light source to excite Fluo-4 at 475 nm and record images at 525/50nm on a cooled CCD-camera (PCO Sencicam-QE, Kelheim, Germany) using TillVisION software (TILL Photonics, Gräfelfing, Germany).

3.5. Data analysis

All image analysis was performed with custom-written routines in Igor Pro. First, although tissues were mechanically restrained and in the presence of nifedipine, some residual movement had to be corrected for, using algorithms in Igor Pro. Regions of interest were drawn, after which average Fluo-4 intensity was calculated, normalized to the initial Fluo-4 values and reported as $\Delta F/F_0$. Neurons were judged 'active' when they displayed at least one Ca^{2+} -spike – defined if the signal rose above baseline plus five times the intrinsic noise (standard deviation) – during the recording. The peak

amplitudes and durations at half width (T50%) were compared between WT and PINK1^{-/-} mice.

4. Results

4.1. Phenotypic characteristics

Macroscopical observation and total colonic length measurements were taken to determine whether if PINK1 mutant mice develop a colonic phenotype that correlates with a constipated or inflamed-like morphology. When compared, these measurements did not report any difference between the two groups (Fig. 1). The total colon length was 62 ± 4 mm and 61 ± 2.5 , for WT and PINK1^{-/-} respectively. The size of the proximal section of the colon, determined by the presence of transverse mucosal bands, showed also similar values in both groups. Thus, proximal colon from WT mice was 30.5 ± 4.5 mm long, while the

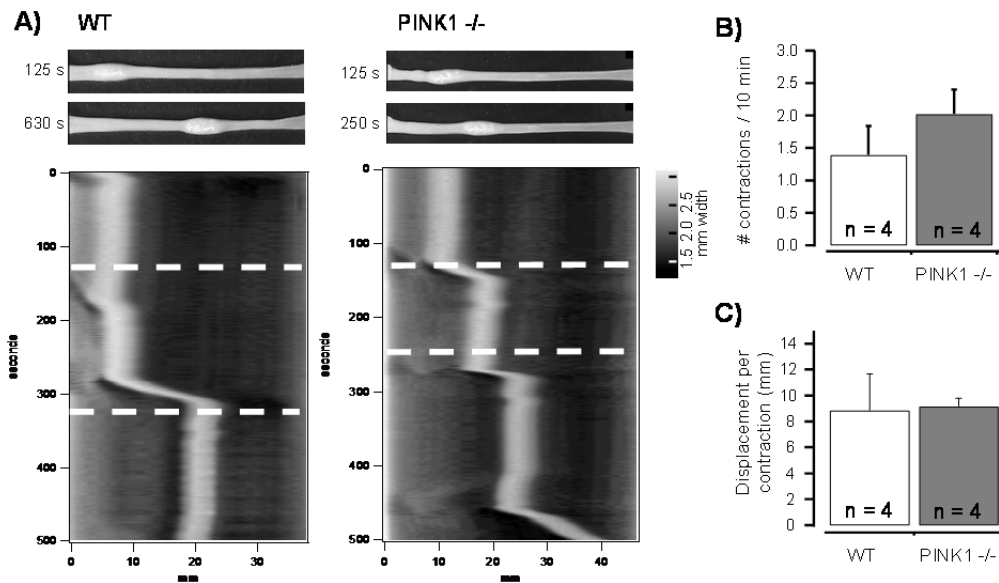


Figure 8: Colonic motility measurements in WT and PINK1^{-/-} mice. A) Artificial pellets were introduced and the large intestine was filmed for 500s. Spatiotemporal maps summarize the movement of the pellet. Upper panels represent the pellet position at the marked times (White dashed lines). Right: Quantification of the frequency of contractile events (B) and the distance the pellet is moved (C).

measurement in PINK1 $-/-$ mice was 28.5 ± 4.3 mm.

4.2. Colonic motility measurements

The analysis of the propulsive capability by spatiotemporal mapping provides information about the frequency of propulsive events and also about the displacement experienced by the artificial pellet on these events (Fig 2A). In our preparation, the WT group had a frequency of peristaltic movements of 1.4 ± 0.4 per 10 minutes, while PINK1 $-/-$ mutants exhibit slightly higher values of 2 ± 0.3 per 10 minutes. When compared, this difference was not statistically significant (Fig. 2B). In the same line, the average distance travelled by the artificial pellet on every propulsive event, did not show any significant difference between the two groups. Pellets inserted in WT organs travelled an average of 8.8 ± 2.4 mm and the ones tested in PINK1 $-/-$ mutants were displaced an average of 9.1 ± 0.6 mm (Fig. 2C).

4.3. Chemical coding of the ENS

Neurodegeneration is the main feature observed in PD. The Lewy pathology associated to enteric neuronal loss in this disease appears prior to the manifestation of the first symptoms or even before the alteration in the CNS (6). It is then possible that changes in the ENS may be detected despite colonic motility and morphology remains unaffected. To assess this possibility, we labeled whole mount preparations of colonic myenteric plexus by immunohistochemistry, using an antibody against HuD/C as a general neuronal marker (Fig 3). This labeling allows us to establish an average value of neurons per ganglion for each group. Surprisingly, PINK1 $-/-$ mice

showed higher counts than WT (38.2 ± 2 vs 29.1 ± 2.8 . $p < 0.05$ Unpaired Student's t-test) indicating a possible neurostimulating mechanism. In order to determine if this increment affects preferentially any of the neuronal subpopulations, a group of samples were co-labeled using antibodies against TH (Fig 3A&B) or nNOS (Fig 3B&C). The percentage of nNOS positive neuronal bodies, was the same in both groups ($52.6 \pm 2\%$ and 52.9 ± 1.4 for WT and PINK1 $-/-$ mice, respectively), and the intensity of the labeling in TH positive nerve terminals and projections, determined by visual analog scale, resulted also similar in WT and mutant mice.

Glial cells are widely distributed surrounding neurons from both enteric plexus. It has been recently reported a mediator role of the microglia in the innate inflammation that precedes damage to the nigrostriatal circuit in PD (20). Taking it into account, it is possible that in our mouse model the enteric glial network might develop changes associated to this early inflamed status. Thus, a group of colonic samples were incubated with an antibody against GFAP (Fig 3 C&D), allowing us to score the integrity of the glial network as well as the intensity of the staining. After visualization and scoring of the samples, no differences were observed between experimental groups.

4.3. Calcium imaging at enteric varicosities.

Mitochondria play a key role in the energy generation for the cell, but these organelles can also transiently buffer substantial amounts of Ca^{2+} ions, modifying local intracellular Ca^{2+} concentrations $[Ca^{2+}]_i$ and membrane potential. In polarized cells, like neurons,

mitochondria are transported from the cell body to the varicosities, where they supply energy and calcium buffering for the vesicle cycle. PINK1 malfunction leads to the

accumulation of damaged mitochondria, affecting the calcium microenvironment of the varicosities as shown in figure 4. The great number of mitochondria located in

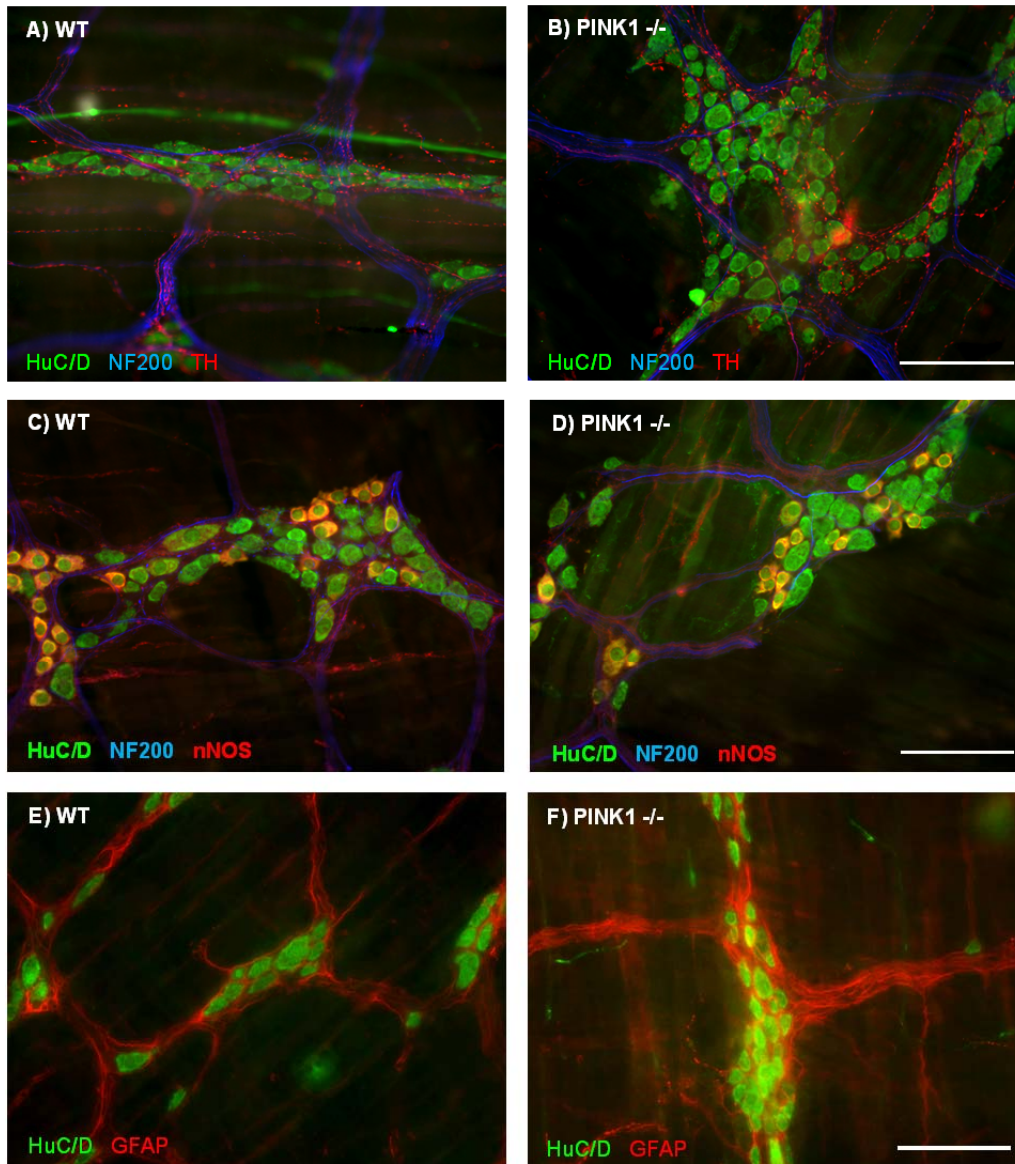


Figure 3: Immuno staining of the ENS of the mouse large intestine. **A & B)** Neuronal markers HuC/D and neurofilament 200 (NF200) were used together with an antibody against tyrosine hydroxylase (TH) **C & D)** Neuronal markers HuC/D and neurofilament 200 (NF200) were used together with an antibody against neuronal nitric oxide synthase (nNOS). **E & F)** Immuno staining of the ENS of the mouse large intestine with the neuronal marker HuC/D and the glia cell marker GFAP. All bars : 100 μm.

these neuronal regions should favor the detection of changes in calcium homeostasis linked to mitochondrial damage.

To test whether calcium homeostasis of varicosities is impaired in PINK1^{-/-} mutant mice, we performed calcium measurements in response to different stimuli: Single pulse of electrical stimulation elicits similar calcium responses in both experimental groups (Fig. 4B). 20Hz electrical pulse applied for one second induced higher calcium responses that significantly differ between groups, being lower in the PINK1^{-/-} mice: $1.49 \pm 0.02 \Delta F/F_0$ vs. $1.38 \pm 0.01 \Delta F/F_0$ for WT and PINK1 mice, respectively ($p < 0.05$ unpaired Student's t-test). At last, supramaximal response was assessed by exposing the ganglion to high concentrations of K⁺ (75mM), resulting also in smaller calcium response in the mutant mice. (WT: $1.6 \pm 0.06 \Delta F/F_0$ and PINK1: $1.56 \pm 0.05 \Delta F/F_0$. $p < 0.05$ unpaired Student's t-test). In this case, the duration at half width of the response was also different, being slower the PINK1^{-/-} mice ($13.8 \pm 1.7s$ vs. $15.6 \pm 1.6s$ for WT and PINK1, respectively. $p < 0.05$ unpaired Student's t-test.).

5. Discussion

In this study, we analyze the colonic physiology in PINK1 deficient mice, an animal model for the PARK6 variant of early onset Parkinsonism. This model was generated by introducing the pathogenic mutation G309D-PINK1 found in patients with the PARK6 variant. PINK1^{-/-} mice develop motor impairment as they age, similar to the symptoms of PD, and also suffer mitochondrial dysfunction even in tissues not affected by the disease, such as the liver. The onset of the motor

symptomatology in those animals was detected around 16 months of age, and no differences were observed when the animals were tested at 4 or 10 months after birth (19). These findings correlate with our data from external morphology or motility of the colon. The absence of differences detected in those assays could be due to that alterations does not manifest in early stages of the life in these mice. Several studies consider PINK1 as a sensor for mitochondrial or cellular stress, acting as a trigger for the mitophagy through the activation of parkin (21-23). Alterations in PINK1 have been proved to induce mitochondrial impairment in cell cultures, fruit flies and mammals (24-26), leading to deregulations in the mitochondrial fission dynamics and increased production of reactive oxygen species (ROS) (17;27;28). These alterations represent a cumulative damage to the neurons, ultimately inducing the characteristic neurodegeneration of PD. In our immunohistochemical preparations we did not report signs of neuronal loss; to the contrary, higher counts in HuD/C staining appeared in the PINK1^{-/-} mice. This particular feature observed in our samples is not the expected result, considering the well documented neuronal loss experienced by certain areas of the CNS as a consequence of PD (3;4). This paradoxical result could rely in the neurostimulating effects of subtle increases in inflammatory cytokines recently described by Gougeon et al. (29). According to that, it is possible that early inflamed neurons responding to the oxidative insult generated by mitochondrial impairment produced inflammatory cytokines that promotes neuronal development. This possibility was observed in patients with ulcerative colitis or Crohn's disease, where ENS abnormalities including ganglia of

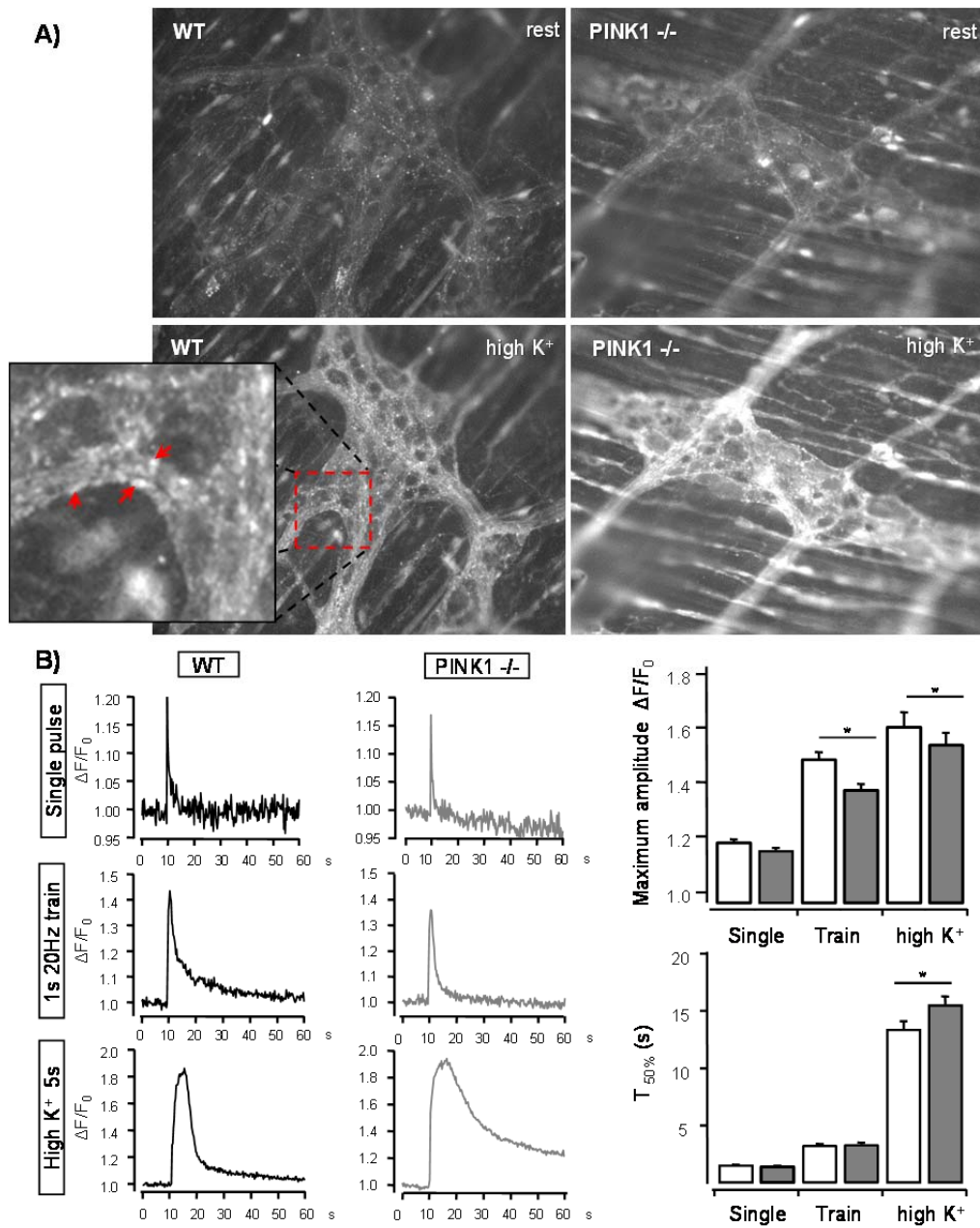


Figure 4: A) Single snapshots from a Fluo-4 recording of the myenteric plexus of the mouse large intestine. Top row are images before the stimulus and bottom row images during a high K⁺ application. The inset shows a magnification of the area boxed in red. Red arrows indicate typical varicosities, which were used for the analysis. B) Example traces of the responses at individual varicosities upon different stimuli. Right. Quantification of the maximum amplitude and the duration at half width T_{50%}. (* indicates P < 0.05. Unpaired student's t test)

increased size (hypertrophy) and/or number (hyperplasia) were detected (30;31).

Mitochondria are directly involved in Ca^{2+} homeostasis behaving as a high capacity, low affinity calcium store. Mitochondrial matrix calcium concentrations increases $[\text{Ca}^{2+}]_m$ when the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rises in response to hormones or neurotransmitters. This linkage follows electrochemical gradient when the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reaches a submicromolar threshold (32). The channels involved in this phenomenon are the mitochondrial Ca^{2+} uniporter and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, acting respectively as entrance and exit pathways for the Ca^{2+} ions (33). In addition to this direct contribution to $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mitochondria also influence the amplitude, spatial spreading and duration of the cytosolic calcium signal by releasing ATP to directly or indirectly fuel cytosolic Ca^{2+} extrusion mechanisms (Ca^{2+} ATPases from plasma membrane and endoplasmic reticulum -PMCA & SERCA- or $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers of the plasma membrane) (26). PINK1 deficiency leads to a reduction in basal ATP levels of neurons in several models (26;34;35). This lower level of available ATP do not affect the calcium homeostasis in resting conditions, but in situations of high energy demand the cytosolic Ca^{2+} metabolism results affected and aberrant cytosolic Ca^{2+} signals could be detected. Thus, it is described that silencing PINK1 impaired agonist-induced mitochondrial Ca^{2+} uptake in different cultured cell lines, resulting in consistently lower mitochondrial calcium concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_M$) in response to these agonists (26). Considering our data, the lower $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in response to electrical stimulus or depolarization induced by high K^+ solution, is in agreement with those previous findings

described by Heeman et al. The high concentration of mitochondria located in the ENS varicosities due to the special energy and calcium handling requirements of these structures, makes its calcium homeostasis much more dependent of the mitochondrial uptake. Regarding calcium extrusion mechanisms, our results shows slower rates of decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after stimulation. This observation is also in concordance with the results obtained in PINK1 deficient cell lines (26).

Taken all together, our results demonstrate that in early stages of life, this model for Parkinson's disease does not develop gastrointestinal symptoms typically present in patients with this neurodegenerative disorder. However, deeper analysis of the status of the ENS revealed incipient changes, changes that correlate with previously described findings in cell lines and suggest a possible prodromal phase that later could derive in a fully established Parkinson phenotype. As described by Gispert et al, most of the general features observed in individuals with Parkinsonism, does not appear in this mutant mice until they age (19), so it is possible that also gastrointestinal symptoms does not develop until later stages in life. The subtle alterations described in this work could make the colon more prone to deregulations in challenging situations such as the oral administration of rotenone, generally used to replicate many aspects of the pathology of human PD, especially neurodegeneration of the substantia nigra and lesions in the ENS. Nevertheless, a recent study in this rotenone model demonstrates that chronic oral treatment with rotenone only induced minor changes in the ENS and does not recapitulate the gastrointestinal

abnormalities seen in PD, while it replicates neurodegeneration of the substantia nigra (36). The combination of these two models could generate a remarkable tool to study the digestive problems associated to PD.

In conclusion, although alterations in Ca^{2+} signaling in the ENS could be detected, PINK1^{-/-} mice of 14 weeks old displayed no obvious motility problems. It may be that the gastrointestinal motility problems that are often associated with PD occur only much later in the life of these PINK1^{-/-} mice.

6. Acknowledgements

Authors truly thanks M. Moons and L. de Dier for their technical assistance.

Supported by FWO. FE Martín Cano is recipient of Doctoral Fellowship from Ministry of science and innovation from Spain (BES-2008-002749) and short stay grant EEBB-I-2011-02678.

7. Reference List

- (1) Katzenschlager R, Head J, Schrag A, Ben-Shlomo Y, Evans A, Lees AJ. Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. *Neurology* 2008 Aug 12;71(7):474-80.
- (2) Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP. Cross sectional prevalence survey of idiopathic Parkinson's disease and Parkinsonism in London. *BMJ* 2000 Jul 1;321(7252):21-2.
- (3) Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet* 2009 Jun 13;373(9680):2055-66.
- (4) Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2013 Feb 4.
- (5) Halliday G, Lees A, Stern M. Milestones in Parkinson's disease--clinical and pathologic features. *Mov Disord* 2011 May;26(6):1015-21.
- (6) Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del TK. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006 Mar 20;396(1):67-72.
- (7) Lebouvier T, Neunlist M, Bruley d, V, Coron E, Drouard A, N'Guyen JM, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One* 2010;5(9):e12728.
- (8) Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol* 1988;76(3):217-21.
- (9) Hawkes CH, Del TK, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007 Dec;33(6):599-614.
- (10) Hawkes CH, Del TK, Braak H. Parkinson's disease: the dual hit theory

revisited. *Ann N Y Acad Sci* 2009 Jul;1170:615-22.

(11) Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, Knels L, Pursche S, Jung R, et al. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One* 2010;5(1):e8762.

(12) Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003 Sep 11;39(6):889-909.

(13) Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004 May 21;304(5674):1158-60.

(14) Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 2010 Jan;8(1):e1000298.

(15) Vives-Bauza C, Przedborski S. PINK1 points Parkin to mitochondria. *Autophagy* 2010 Jul;6(5):674-5.

(16) Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 2010 Apr 19;189(2):211-21.

(17) Morais VA, Verstreken P, Roethig A, Smet J, Snellinx A, Vanbrabant M, et al. Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Mol Med* 2009 May;1(2):99-111.

(18) Amo T, Sato S, Saiki S, Wolf AM, Toyomizu M, Gautier CA, et al. Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiol Dis* 2011 Jan;41(1):111-8.

(19) Gispert S, Ricciardi F, Kurz A, Azizov M, Hoepken HH, Becker D, et al. Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive

mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PLoS One* 2009;4(6):e5777.

(20) Watson MB, Richter F, Lee SK, Gabby L, Wu J, Masliah E, et al. Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp Neurol* 2012 Oct;237(2):318-34.

(21) McBride HM. Parkin mitochondria in the autophagosome. *J Cell Biol* 2008 Dec 1;183(5):757-9.

(22) Kim Y, Park J, Kim S, Song S, Kwon SK, Lee SH, et al. PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Dec 19;377(3):975-80.

(23) Zhou C, Huang Y, Shao Y, May J, Prou D, Perier C, et al. The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Aug 19;105(33):12022-7.

(24) Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Yao Z, Abramov AY, Miljan EA, Keen G, et al. PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS One* 2008;3(6):e2455.

(25) Wang D, Qian L, Xiong H, Liu J, Neckameyer WS, Oldham S, et al. Antioxidants protect PINK1-dependent dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Sep 5;103(36):13520-5.

(26) Heeman B, Van den Haute C, Aelvoet SA, Valsecchi F, Rodenburg RJ, Reumers V, et al. Depletion of PINK1 affects mitochondrial metabolism, calcium homeostasis and energy maintenance. *J Cell Sci* 2011 Apr 1;124(Pt 7):1115-25.

(27) Deng H, Dodson MW, Huang H, Guo M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Sep 23;105(38):14503-8.

(28) Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Feb 5;105(5):1638-43.

(29) Gougeon PY, Lourenssen S, Han TY, Nair DG, Ropeleski MJ, Blennerhassett MG. The pro-inflammatory cytokines IL-1beta and TNFalpha are neurotrophic for enteric neurons. *J Neurosci* 2013 Feb 20;33(8):3339-51.

(30) Geboes K, Collins S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil* 1998 Jun;10(3):189-202.

(31) Lomax AE, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA. Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. *Auton Neurosci* 2006 Jun 30;126-127:250-7.

(32) Nicholls DG. Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium* 2005 Sep;38(3-4):311-7.

(33) Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 Nov;291(5):C1082-C1088.

(34) Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, et al. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 2006 Jun 29;441(7097):1157-61.

(35) Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, et al. *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 2006 Jun 29;441(7097):1162-6.

(36) Tasselli M, Chaumette T, Paillusson S, Monnet Y, Lafoux A, Huchet-Cadiou C, et al. Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice. *Neurogastroenterol Motil* 2013 Mar;25(3):e183-e193.

Cell Calcium (Sent for publication)

PROPAGATION OF INTRACELLULAR Ca^{2+} SIGNALS IN AGED EXOCRINE CELLS

Franciso E. Martin-Cano, Cristina Camello-Almaraz, Maria J Pozo and Pedro J Camello

Dpt. Physiology, Faculty of Nursing and Occupational Therapy, University of
Exrtemadura, 10003 Cáceres, Spain

Running title: Calcium in aged exocrine pancreas.

Correspondence to:

Dr Pedro J Camello

Dpt. of Physiology

Faculty of Veterinary Sciences and Faculty of Nursing

10003 Cáceres, Spain

pcamello@unex.es

Keywords: Calcium signalling, aging, exocrine pancreas, mitochondria, cholecystokinin, acetylcoline.

CONTENTS

- 1.- Abstract
- 2.- Introduction
- 3.- Methods
 - 3.1.- Animals
 - 3.2.- Cell isolation and handling
 - 3.3.- $[Ca^{2+}]_i$ determination
 - 3.4.- Determination of mitochondrial potential
 - 3.5.- Statistics
 - 3.6. Reagents and drugs
- 4.- Results
- 5.- Discussion
- 6.- Acknowledgements
- 7.- References

1. Abstract

One of the consequences of aging is alteration of calcium signals, but information regarding the mechanisms involved is scarce. The aim of this study was to determine the effects of aging on propagation of Ca^{2+} signals in pancreatic acinar cells. Fura-2 loaded cells isolated from young (3-4 month old) and aged (24 month old) mouse responded to ACh and CCK with a polarized Ca^{2+} response initiated at the apical or secretory pole before spreading to the basal pole. Aging slowed down the propagation of the Ca^{2+} response to ACh but enhanced the velocity of the CCK response. This pattern can be explained by the age-induced depolarization of mitochondria, because it can be reproduced in young cells by mitochondrial inhibitors. Aging also increased the role of the acidic stores in the CCK signal, as judged by the suppression of the polarization after folimycin treatment in aged but not in young cells. Aging also increased the involvement of RyR in the ACh signal, as indicates the loss of polarization after 8Br-cADPr, a RyR agonist. Therefore, we conclude that aging modifies differentially the ACh and CCK-evoked polarized Ca^{2+} signals through the age-related mitochondrial depolarization, and alters the involvement of the acidic Ca^{2+} stores and the RyR in the generation of polarized signals.

2. Introduction

One of the consequences of aging is the development of modifications in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signals induced by cell agonists (1-7). The importance of these changes is obvious given the involvement of this signaling system in all the functions of any cell, from proliferation, differentiation and

cell fate to contraction, metabolism or secretion (1;4).

We have previously shown that aging induces a down-regulation of the secretory function of mouse acinar cells. This was underlaid by impairment of different aspects of calcium signal, such as responses to physiological and supraphysiological level of stimulation, Ca^{2+} clearing mechanisms and capacitative calcium entry (1).

Pancreatic acinar cells are a classic model to study $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signaling mechanisms and exocytosis. This polarized cell type exhibits local $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses restricted to the apical pole that eventually propagate towards the basolateral pole after exceeding the mitochondrial network surrounding the secretory pole (for a review see (8)). Low-level stimulation (cholinergic input during the cephalic phase of digestion and also postprandial CCK levels during the intestinal phase) induces repetitive $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients localized at the apical or secretory pole of the cell to stimulate exocytosis and the accompanying ionic transport. Eventually, some of these signals spread all across the cytosol towards the basal pole in order to regulate ion transport, protein secretion and metabolism to support the secretory function of the cell (8;9). Any change in the mechanisms propagating the intracellular Ca^{2+} signals is very important not only experimentally but due to its possible impact in the physiological function of the cell. However, the subcellular propagation of the polarized $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response of this cell type has not been studied in aged individuals.

The triggering and spreading of the polarized responses relies on interplay between different Ca^{2+} stores operated by

IP₃, cADPr and NAADP. The apical area of pancreatic acinar cells is very sensitive to intracellular messengers acting at intracellular Ca²⁺ releasing channels (IP₃R, RyR and probably NAADP receptors), and behaves as a “trigger” zone for Ca²⁺ signals which then spread as calcium induced calcium release (CICR) through the same receptors (10;11). Mitochondria have been reported to regulate the propagation of these signals but with apparently contradictory conclusions (12-14). As mitochondria in aged acinar cells show a partial depolarization (1), we explored in this study the possibility that age induces modifications of the propagation of intracellular [Ca²⁺]_i signals in pancreatic acinar cells.

3. Material and Methods

3.1. Animals

Mice (Swiss OF1) were divided into two groups according to age: young adults (3 months old) and aged (22-24 months old). Animals were housed in light (12 hr light-12 hr dark cycle) and temperature (20°C) controlled rooms and had free access to food. Water access was restricted to the dark cycle.

3.2. Cell isolation and handling

Animal sacrifice was performed following ethical guidelines of the Ethical Committee of the University of Extremadura. A suspension of single cells and small acini was prepared from pancreas by injection with purified collagenase (from *Clostridium histolyticum*, 200U/ml, 37°C, 6-12 min) followed by vigorous manual agitation and gentle pipetting (15). After isolation, cells were suspended in physiological solution (Na-HEPES)

containing (mM): 140 NaCl, 4.7 KCl, 2 CaCl₂, 1.1 MgCl₂, 10 glucose, 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-sulfonic acid (HEPES) and 0.01% trypsin inhibitor (soybean), pH 7.4.

3.3. [Ca²⁺]_i determination

Once loaded with the fluorescent calcium indicator fura-2 AM (1-2 μM, 30 min, room temperature), cells were washed, allow to rest for 20-30 min for dye de-esterification, and used within the next 2-4 hours. A small volume of the cell suspension was placed on a perfusion chamber made with a poly-D-Lys-coated coverslip (thickness 0.17 mm), placed on the stage of an inverted fluorescence-equipped microscope (Nikon TE2000, Barcelona, Spain) and viewed with a 100x objective (oil immersion). Extracellular application of agonists and inhibitors was performed by a gravity perfusion system at room temperature. Cells were excited by a computer controlled monochromator (Optoscan, Cairn Research Ltd., Kent, UK) at 340/380 nm, and the emitted fluorescence (510 nm, band pass filter) was recorded with a cooled CCD camera (Orca-II-ER, Hamamatsu Photonics, Cerdanyola, Spain) and dedicated software (Metafluor, Molecular Devices, Downingtown, PA, USA). For each experiment the scanned field of view was cropped to the size of the studied cell, and the pixel size was X micrometers. This allowed a recording speed of 5-10 pairs of 340/380 nm images per second. Changes in cytosolic Ca²⁺ concentration are expressed as changes in the ratio between the fluorescence emission at 340 and at 380nm excitation wavelengths (F₃₄₀/F₃₈₀) after background subtraction.

3.4. Determination of mitochondrial potential

To assess mitochondrial potential pancreatic acinar cells were loaded with 100 nM TMRM during 10 min at room temperature, placed on a perfusion chamber made with a poly-D-Lys-coated coverslip (thickness 0.17 mm) in the stage of a inverted laser scanning confocal microscope (Nikon A1, Barcelona, Spain) and viewed with a 60x objective (oil immersion) using 1.2 Airy units iris aperture. Cells were excited at 490 nm and the emitted

fluorescent images ($>255 \pm 15$ nm, band-pass filter) was recorded at room temperature at 1 Hz.

3.5. Statistics

Analysis and quantification of the images was performed using Metaflur Analyst (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA) and Fiji distribution of ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012) (16). Results were expressed as mean \pm sem

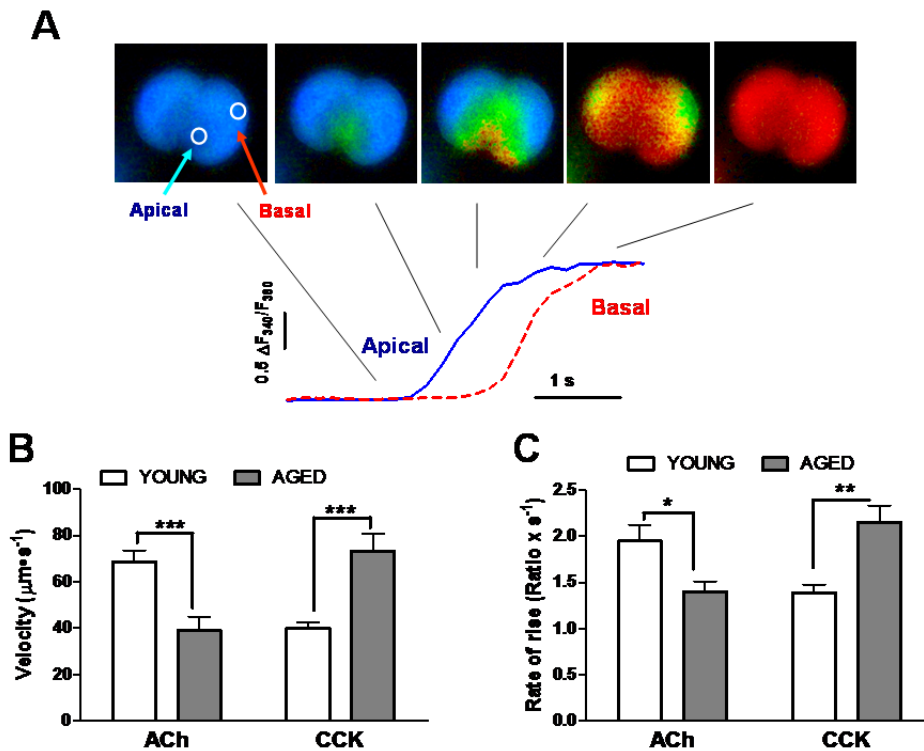


Figure 1. Propagation of Ca²⁺ signals in response to ACh (10 μM) and CCK (1 nM) in pancreatic acinar cells isolated from young and aged mice. (A) A representative trace showing the response to CCK at the apical and basal areas of the cell as indicated in the top left image. The associated frames show the fura-2 ratio (F₃₄₀/F₃₈₀) images using a color code (blue to red, low to high ratio) at the marked time points of the response. (B) and (C) Histograms showing the average values of the velocity and the rise of rate of the responses. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005. n=22 -32 cells. Figure 1. Propagation of Ca²⁺ signals in response to ACh (10 μM) and CCK (1 nM) in pancreatic acinar cells isolated from young and aged mice. (A) A representative trace showing the response to CCK at the apical and basal areas of the cell as indicated in the top left image. The associated frames show the fura-2 ratio (F₃₄₀/F₃₈₀) images using a color code (blue to red, low to high ratio) at the marked time points of the response. (B) and (C) Histograms showing the average values of the velocity and the rise of rate of the responses. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005. n=22 -32 cells. The yellow bar of the first frame represents 10 μm.

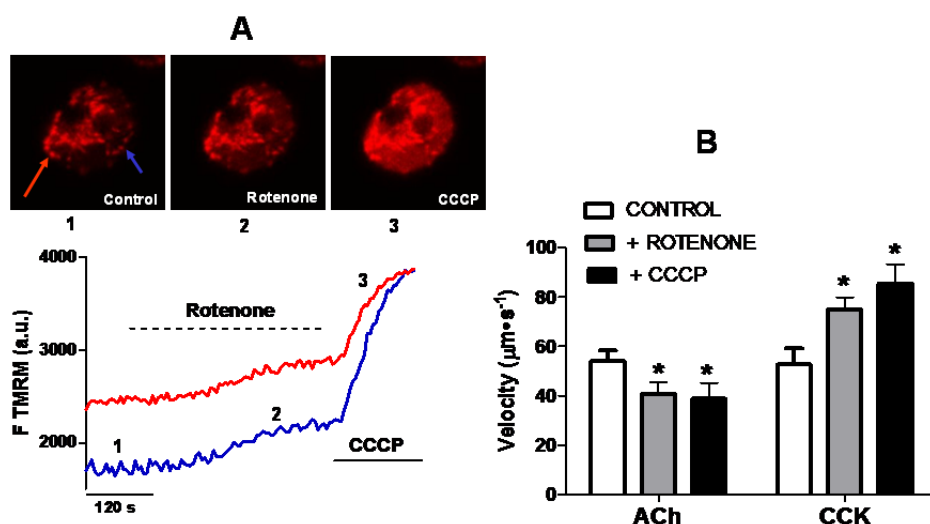


Figure 2 (A) Representative traces showing the depolarization induced by rotenone (0.3 µM) and CCCP (50 nM) in two mitochondrial areas indicated in the top left image. The three top images show the TMRM fluorescence of the pancreatic acinar cell at the time points indicated by the numbers. (B) Effects of rotenone and CCCP pretreatment on the propagation velocity of the responses to ACh (10 µM) and CCK (1 nM) in young pancreatic acinar cells. * $p < 0.05$ respect control cells. $n = 5-16$ cells. (Two way anova: $F = 6.98$, $p < 0.005$ for interaction of age and treatment)

(standard error of the mean), and we indicate the number of cells and/or the number of independent preparations (isolated from different animals) used in each experimental group. Two way ANOVA test was used for comparison of age groups and treatments, followed by planned comparisons tests between selected groups. Student's *t* test was used for comparison between two groups. Differences were considered significant for $P < 0.05$. To calculate the velocity of propagation of the signal (pixels \times s⁻¹) we estimated the time between initiation of the signal at the apical pole of the cell and at the last spot of the basolateral pole developing the response. The criteria for initiation was the time point when the ratio of fluorescence reached 5% of the amplitude of the response (equal to 2-3 SD of the resting values).

3.6. Reagents and drugs

Collagenase (type CLSPA) was obtained from Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ, USA). Fura-2 (acetoxymethyl ester) and TMRM were purchased from Molecular Probes (Invitrogen SA, Barcelona, Spain). Melatonin, trypsin inhibitor, ACh and CCK (cholecystokinin octapeptide sulphate) and other common reagents were from Sigma-Aldrich Química (Madrid, Spain).

4. RESULTS

Application of either ACh (10 µM) or CCK (1 nM) induced a polarized $[Ca^{2+}]_i$ response in mouse pancreatic acinar cells. In both cases, the signal started in the apical or secretory pole and then spread toward the basolateral area of the cell as a wave or tide. This initiating or trigger area was clearly visible as a rising $[Ca^{2+}]_i$ spot, and is a well

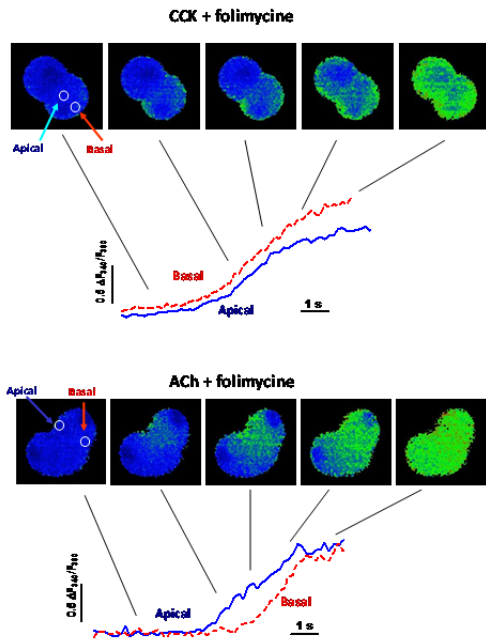


Figure 3 Folimycine suppressed in aged cells the polarization of the calcium signal induced by CCK 1 nM (top) but by ACh 10 μ M (bottom panel). The traces are representative of 12 (CCK) and 8 cells (ACh), and represent the subcellular calcium changes in the apical and basal pole of the cells presented in the ratio images at different time points of the response.

known feature of the $[Ca^{2+}]_i$ signal in this cell type. The velocity of propagation was higher for ACh (68.73 ± 4.91 , $n=32$) than for CCK (39.92 ± 2.41 , $n=25$) in cells isolated from young mice ($p < 0.005$). The maximal rate of rise ($dRatio\ fura-2/dt$) also showed higher values for ACh (1.95 ± 0.17) than for CCK (1.39 ± 0.09 ; $p < 0.05$). Aging induced a clear differential effect on the two responses, as shown in figure 1. Propagation of the ACh response was impaired in aged cells (39.15 ± 5.92 , $n=22$, $p < 0.005$ respect to young cells), similar to rate of response (1.40 ± 0.11 , $p < 0.05$). On the contrary, in aged cells the CCK response showed increases in the velocity of propagation

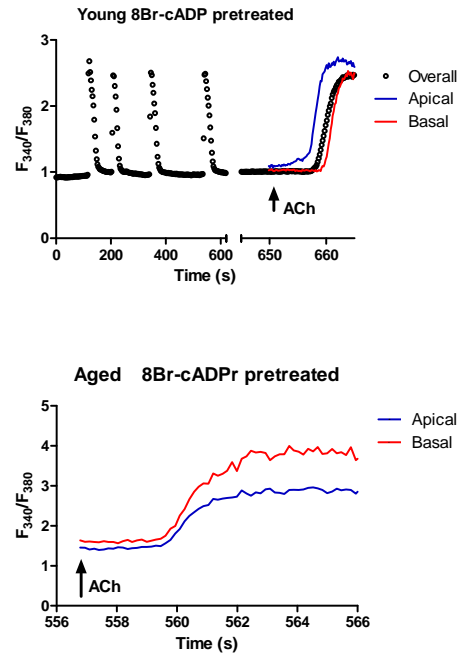


Figure 4 Effect of 8Br-cADPr (50 μ M) pretreatment on 10 μ M ACh-induced calcium signal in young and aged mouse pancreatic acinar cells. The top graph shows the cyclic Ca^{2+} increase induced by 8Br-cADPr during the pretreatment period (black circles) in the overall cytosol sampled at slow rate. The color lines represent the subcellular response during the high frequency sampling period initiated at the ACh application. Note that depolarization of the signal was absent in aged but not in young cells. Representative of 3 independent preparations.

(73.28 ± 7.58 , $n=27$, $p < 0.005$) and in the rate of rise (2.16 ± 0.18 , $p < 0.01$).

A detailed analysis of the rates of rise of the apical and basal poles of the cells showed that the effect of ACh and CCK was dependent on age ($F = 3.65$, $p < 0.0003$). Aging induced a significant decrease in the rate of response to ACh in the basal pole (young 2.38 ± 0.24 , aged 1.51 ± 0.17 , $p < 0.005$) but not in the apical, whereas the response to CCK was enhanced both in the basal (young 1.72 ± 0.14 , aged 2.78 ± 0.27 , $p < 0.01$) and the apical pole (young $1.062 \pm$

0.05, aged 1.53 ± 0.14 , $p < 0.01$). This result suggests that aging induced different alterations in the mechanisms of the response of the two cell areas.

A possible explanation for the differential effect of aging on ACh and CCK responses are the mitochondrial alterations in aged cells. If mitochondria delay the propagation of CCK response but reinforce the propagation of the ACh signal, the partial depolarization of mitochondria reported in aged pancreatic acinar cells (1) could contribute to the changes induced by aging. To assess this possibility, in a series of experiments we checked the effects of the mitochondrial inhibitors rotenone ($0.3 \mu\text{M}$) or CCCP (50 nM) on the propagation of the responses to ACh and CCK. Figure 2 shows that in our experimental conditions a short exposure (3-6 min) to rotenone or CCCP reduces mitochondrial potential, as revealed by changes in the fluorescence of TMRM, a nernstian mitochondrial probe. The effects of the mitochondrial inhibitors on the Ca^{2+} signal is shown in figure 2. As predicted, the propagation of the ACh response was slowed down by rotenone and CCCP ($p < 0.05$), in keeping with the effect of aging. On the contrary, in the case of CCK the inhibitors induced a slight but significant increase in the speed of propagation, resembling again the effect of aging on this parameter.

Acidic Ca^{2+} stores are a source for Ca^{2+} release in pancreatic acinar cells (17;18), where the apical pole is densely packed with secretory and endosomal acidic vesicles which respond to intracellular Ca^{2+} releasing messengers (18;19). Therefore, we tested the effect of folimycin, a specific inhibitor of the V-type H^{+} pump located of the acidic stores. As for CCK in young cells,

folimycin induced a non significant reduction in the speed of propagation, but in the case of aged cells it induced a clear suppression of the polarized response: 9 out of 12 cells showed a simultaneous response, with absent or negligible polarization (whereas in control aged cells this pattern was observed only in 4 out of 41 cells) (figure 3). In the 3 cells showing a polarized response the velocity was clearly inhibited (48.56 ± 7.78 , $p < 0.05$) when compared to untreated cells. On the contrary, in the case of ACh folimycin did not modify significantly the polarized response neither in young nor aged cells. Folimycin induced a similar pattern in the rise of rate, although the decrease in the response to CCK in aged cells was not significant.

To initiate the polarized response, ACh and CCK use respectively IP_3 and cADPr as the main intracellular messengers to activate the Ca^{2+} release channels IP_3R and RyR (8). To assess the role of cADPr-sensitive Ca^{2+} pools (bearing RyR receptors) in the polarized response we pretreated the cells with the analogue 8Br-cADPr. This treatment increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$, both as a slowly rising plateau (in aged cells) or as slow oscillations (young cells) reminiscent of the response induced by postprandial levels of CCK (figure 4). The consequence of this treatment for ACh and CCK responses was different. 8Br-cADPr blocked the polarization of the CCK response in all the tested cells, both young and aged. In the case of ACh the pretreatment only reduced the speed of the Ca^{2+} wave (31.10 ± 4.52 , $n=8$, $p < 0.01$ respect to control ACh-stimulated cells) but suppressed the polarization in all the aged cells, similar to aged cells stimulated with CCK. This result suggests that the role of

RyR in the trigger area is more important for CCK than for ACh signals, and it is increased for ACh in aged cells.

5. Discussion

Our study shows that aging induces in pancreatic acinar cells a differential modification of the propagation of $[Ca^{2+}]_i$ signals. This alteration is likely associated to modifications in the mitochondrial status and in the role of intracellular stores in the generation and spreading of the Ca^{2+} signal.

Besides their metabolic role, mitochondria are considered a key factor in the regulation of Ca^{2+} signals (20) and redox balance (21), and therefore the alterations observed in aged cells have been proposed to explain the biology of aging (22;23). We have previously shown that in aged mouse pancreatic acinar cells mitochondria are partially depolarized compared to young cells (1), similar to other cell types in aged individuals (24). Our finding that mitochondrial inhibitors reproduce in aged cells the differential effects of aging on two Ca^{2+} releasing agonists strongly supports mitochondrial depolarization as a causal process for age-related alterations in Ca^{2+} signals. Although this is, to our knowledge, the first report of this differential effect in a single cell type, has a mechanistic precedent in the apparently conflicting reports of the effect of mitochondria on Ca^{2+} signal propagation. So, while in glial and smooth muscle cells mitochondria seem to support propagation (25;26) based on positive feedback on the IP3R function, similar to ACh in pancreatic acinar cells (14), other reports indicate a restrictive role for mitochondria in the spreading of the signal (13;20;27). It is likely that the highly variable regulation of

IP3R and RyR can be differentially controlled by the Ca^{2+} importing activity of closely placed mitochondria, the final output depending on the exact spatiotemporal arrangements of the involved elements.

The present finding that aging increases velocity of CCK-evoked responses also makes unlikely that aging operates simply rendering the cells more frail and unresponsive to signals (for example by down-regulation of receptors). In hippocampal neurons aging also induces exacerbation of some aspects of Ca^{2+} signals (5), similar to stimulus-specific changes of Ca^{2+} signals in urinary bladder smooth muscle (2).

In addition to the consequences of mitochondrial alterations, the present work indicates that the subcellular mechanisms involved in the $[Ca^{2+}]_i$ response could be differentially modified in aged cells. Specifically, we found that aging increased the dependence of CCK response on acidic stores, and the participation of RyR in the propagation of ACh response. ACh and CCK show differences in their downstream signalling pathway. Although both use IP3R, RyR and acidic stores to generate local and global responses, CCK has been reported to rely more in cADPr (that binds to endoplasmic reticulum RyR receptors) and in NAADP (that binds the two pore channels placed at endosomes) (8;28). On the contrary, ACh seems to depend specifically on IP3 synthesis (8) to initiate the signal. It could be possible therefore that aged cells lose some of the elements regulating the RyR and/or the IP3R. In fact, hippocampal neurons and colon smooth muscle cells have been reported to show that type of changes (29;30) during aging. Regarding the shift in acidic stores

involvement, it is tempting to speculate that the changes induced by aging in the lysosomal-endosomal compartment (22) could lead to modifications of Ca²⁺ signals related to NAADP. Actually, a recent study reports that induction of lysosome proliferation enhances Ca²⁺ signals (31).

In conclusion, our study shows that aging can affect the propagation of calcium signals in a stimulus-specific pattern due to changes in the mitochondrial status and the subcellular pools responsiveness.

6. Acknowledgements

Supported by BFU2011-24365, RETICEF RD12/0043/0016, FEDER and Junta de Extremadura (GR10009).

7. Reference List

- (1) Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Age-related alterations in Ca²⁺ signals and mitochondrial membrane potential in exocrine cells are prevented by melatonin. *J Pineal Res* 2008 Sep;45(2):191-8.
- (2) Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Aging differentially modifies agonist-evoked mouse detrusor contraction and calcium signals. *Age (Dordr)* 2011 Mar 1;33:81-8.
- (3) Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Baba A, Matsuda T, Camello PJ. Ca²⁺ extrusion in aged smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 2007 Sep 15;74(6):860-9.
- (4) Toescu EC, Vreugdenhil M. Calcium and normal brain ageing. *Cell Calcium* 2010 Feb;47(2):158-64.
- (5) Gant JC, Sama MM, Landfield PW, Thibault O. Early and simultaneous emergence of multiple hippocampal biomarkers of aging is mediated by Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *J Neurosci* 2006 Mar 29;26(13):3482-90.
- (6) Del CC, Ostrovskaya O, McAllister CE, Murray K, Hatton WJ, Gurney AM, et al. Effects of aging on Ca²⁺ signaling in murine mesenteric arterial smooth muscle cells. *Mech Ageing Dev* 2006 Apr;127(4):315-23.
- (7) Howlett SE, Grandy SA, Ferrier GR. Calcium spark properties in ventricular myocytes are altered in aged mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 Apr;290(4):H1566-H1574.
- (8) Petersen OH, Tepikin AV. Polarized calcium signaling in exocrine gland cells. *Annu Rev Physiol* 2008;70:273-99.
- (9) Kasai H, Augustine GJ. Cytosolic Ca²⁺ gradients triggering unidirectional fluid secretion from exocrine pancreas. *Nature* 1990 Dec 20;348(6303):735-8.
- (10) Ashby MC, Craske M, Park MK, Gerasimenko OV, Burgoyne RD, Petersen OH, et al. Localized Ca²⁺ uncaging reveals polarized distribution of Ca²⁺-sensitive Ca²⁺ release sites: mechanism of unidirectional Ca²⁺ waves. *J Cell Biol* 2002 Jul 22;158(2):283-92.
- (11) Sneyd J, Tsaneva-Atanasova K, Bruce JI, Straub SV, Giovannucci DR, Yule DI. A model of calcium waves in pancreatic and parotid acinar cells. *Biophys J* 2003 Sep;85(3):1392-405.
- (12) Tinel H, Cancela JM, Mogami H, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Tepikin AV, et al. Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca(2+) signals. *EMBO J* 1999 Sep 15;18(18):4999-5008.
- (13) Camello-Almaraz C, Salido GM, Pariente JA, Camello PJ. Role of mitochondria in Ca(2+) oscillations and shape of Ca(2+) signals in pancreatic acinar cells. *Biochem Pharmacol* 2002 Jan 15;63(2):283-92.
- (14) Gonzalez A, Schulz I, Schmid A. Agonist-evoked mitochondrial Ca²⁺ signals in mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 2000 Dec 8;275(49):38680-6.

- (15) Camello-Almaraz C, Pariente JA, Salido G, Camello PJ. Differential involvement of vacuolar H(+)-ATPase in the refilling of thapsigargin- and agonist-mobilized Ca(2+) stores. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 May 10;271(2):311-7.
- (16) Schindelin J, Rganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012 Jul;9(7):676-82.
- (17) Gonzalez A, Pariente JA, Salido GM, Camello PJ. Intracellular pH and calcium signalling in rat pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch* 1997 Sep;434(5):609-14.
- (18) Gerasimenko JV, Sherwood M, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV. NAADP, cADPR and IP3 all release Ca2+ from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J Cell Sci* 2006 Jan 15;119(Pt 2):226-38.
- (19) Menteyne A, Burdakov A, Charpentier G, Petersen OH, Cancela JM. Generation of specific Ca(2+) signals from Ca(2+) stores and endocytosis by differential coupling to messengers. *Curr Biol* 2006 Oct 10;16(19):1931-7.
- (20) Walsh C, Barrow S, Voronina S, Chvanov M, Petersen OH, Tepikin A. Modulation of calcium signalling by mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2009 Nov;1787(11):1374-82.
- (21) Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca2+ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 Nov;291(5):C1082-C1088.
- (22) Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 2002 Apr;269(8):1996-2002.
- (23) Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang JC, Aris JP, Leeuwenburgh C. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci* 2010 Aug 1;123(Pt 15):2533-42.
- (24) Gomez-Pinilla PJ, Gomez MF, Sward K, Hedlund P, Hellstrand P, Camello PJ, et al. Melatonin restores impaired contractility in aged guinea pig urinary bladder. *J Pineal Res* 2008 May;44(4):416-25.
- (25) Olson ML, Chalmers S, McCarron JG. Mitochondrial Ca2+ uptake increases Ca2+ release from inositol 1,4,5-trisphosphate receptor clusters in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2010 Jan 15;285(3):2040-50.
- (26) Simpson PB, Russell JT. Mitochondria support inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca2+ waves in cultured oligodendrocytes. *J Biol Chem* 1996 Dec 27;271(52):33493-501.
- (27) Hajnoczky G, Hager R, Thomas AP. Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors by Ca2+. *J Biol Chem* 1999 May 14;274(20):14157-62.
- (28) Yamasaki M, Thomas JM, Churchill GC, Garnham C, Lewis AM, Cancela JM, et al. Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked Ca2+ spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr Biol* 2005 May 10;15(9):874-8.
- (29) Gant JC, Chen KC, Norris CM, Kadish I, Thibault O, Blalock EM, et al. Disrupting function of FK506-binding protein 1b/12.6 induces the Ca(2+)-dysregulation aging phenotype in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2011 Feb 2;31(5):1693-703.
- (30) Martin-Cano FE, Camello-Almaraz C, Hernandez D, Pozo MJ, Camello PJ. mTOR pathway and Ca2+ stores mobilization in aged smooth muscle cells. *Aging (Albany NY)* 2013 May 8.
- (31) Dickinson GD, Churchill GC, Brailoiu E, Patel S. Deviant nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-mediated Ca2+ signaling upon lysosome proliferation. *J Biol Chem* 2010 Apr 30;285(18):13321-5.

Discusión general

A blue square containing the Roman numeral VI in white serif font.

VI

El efecto del envejecimiento sobre la motilidad del colon, uno de los principales objetivos planteados en este proyecto de tesis, lo hemos abordado desde una nueva perspectiva al estudiar la influencia y efectos de la edad en capas a las que tradicionalmente no se las ha considerado con influencia en los patrones motores del colon: capas mucosa y submucosa, cuya principal función es el control de los mecanismos secretores y absortivos del colon.

Tradicionalmente los estudios de motilidad en baño de órganos se han llevado a cabo en tiras de colon en las que se diseccionaban las capas mucosa y submucosa, por lo que hay muy pocos estudios en los que se incluyan estas capas y ello hace imposible la comparación de nuestros resultados con los de otros autores.

Con respecto a la mucosa hemos encontrado que sí tiene influencia en el control tanto de la contractilidad fásica espontánea (CFE, Cap 1), como de la inducida por agonistas exógenos (despolarización con medio rico en potasio o estimulación con betanecol) o por liberación de neurotransmisores entéricos mediante estimulación eléctrica de campo (Cap 2). Siendo Es muy llamativo el hallazgo de que esta influencia tienega carácter antagónico , siendo su papel excitatorio o procinético en la motilidad espontánea, e inhibitorio en la respuesta a estímulos miógenos o neurógenos. El origen de las CFE del colon parecen ser fundamentalmente las células intersticiales de Cajal, siendo este patrón motor básico regulado por la actividad basal de los plexos nerviosos entéricos (submucoso y mientérico). Nuestros estudios apoyan esta hipótesis, ya que la inhibición de los nervios inhibitorios nitrérgicos es mediadora del efecto potenciador de la mucosa sobre la actividad espontánea. Los efectos estimuladores de la mucosa se hacen notar también sobre el tono basal, que se modifica paralelamente a como lo hace las CFE en los diferentes grupos experimentales. Este efecto potenciador lo ejerce únicamente la mucosa del colon proximal, desapareciendo este control en el colon distal, al menos en la especie y cepa animal estudiada (lo que puede explicarse en base a las diferencias encontradas en los niveles de estrés oxidativos de ambas porciones del colon (Cap 5). La mucosa pierde relevancia al envejecer el animal, como consecuencia de las modificaciones que acontecen en la participación del SNE en el control de la CFEs y del propio envejecimiento de la mucosa, que se hace menos efectiva en su influencia sobre los nervios inhibitorios. Neurotransmisores inhibidores son también los efectores del papel inhibitorio que la mucosa juega en condiciones de estimulación del colon. Efecto relevante en cuanto a su magnitud (más del 50% de inhibición) y que aparece también cuando se estimulan los plexos entéricos, principal estímulo de la contractilidad colónica. El hecho de que la mucosa aislada sea capaz de reducir la respuesta a estímulos, y que bloqueantes de los llamados "gasoneurotransmisores", que también se sintetizan en las células epiteliales de la mucosa, anulen dichos efectos sugiere que estas moléculas son liberadas desde las células epiteliales y tras difundir a las capas musculares ejercen su función inhibitoria. La diferente magnitud de las inhibiciones que ejerce la mucosa cuando está aislada o adherida al plexo submucoso, sugiere que no podemos descartar que parte de este control negativo se ejerza a través del sistema nervioso entérico. Nuestros resultados suponen un nuevo paradigma en las funciones de la mucosa: el control de la motilidad para acompañar sus funciones secretoras y absortivas. Futuras investigaciones en este campo servirán para apoyar o rechazar este modelo.

Menos marcado es el efecto que ejerce el plexo submucoso y su modificación por la edad (Cap 3) tanto sobre las CFEs como sobre las respuestas miógena y neurógena. Este plexo tiene un efecto inhibitorio notorio sobre las CFEs del colon proximal de animales envejecidos como consecuencia, probablemente de una activación de fibras nitrérgicas que pudiera estar mediada por mediada por nervios colinérgicos. Es destacable la poca contribución de fibras nitrérgicas en las CFEs en tiras mientéricas procedentes de animales envejecidos, sobre todo teniendo en cuenta que trabajos estructurales en el área coinciden en que estas fibras no sufren alteraciones relacionadas con la edad. En cualquier caso los resultados obtenidos con TTX apuntan también a un escaso papel del control nervioso en la actividad espontánea del colon envejecido. Tal y como se recoge en el Cap 1, el colon distal tiene menos alteraciones funcionales al envejecer, de hecho, las respuestas contráctiles en respuesta a despolarizaciones no son edad-dependientes, apareciendo cambios significativos relacionados con la edad en la respuesta de tiras mientéricas a agonistas muscarínicos. En el colon proximal no hay apenas influencia del plexo submucoso en la contractilidad inducida por betanecol, pero la edad reduce esta respuesta. La atenuación en la contracción inducida por agonistas colinérgicos puede afectar a las respuestas musculares a la EFS, tal y como ocurre en tiras mientéricas de colon proximal envejecido. El plexo submucoso ejerce un efecto inhibitorio, que desaparece en el envejecimiento, compensando por tanto, las respuestas neurógenas del colon proximal como consecuencia de una reducción en el componente nitrérgico en tiras envejecidas con plexo submucoso. En el colon distal no se producen cambios relacionados con la presencia de submucoso en ninguno de los dos grupos de edad. Sin embargo, considerando la preparación con submucoso, en animales envejecidos la respuesta neurógena es ligeramente mayor en animales viejos, lo que puede ser la consecuencia de un incremento en la contribución adrenérgica-colinérgica, encaminada a compensar posibles déficits en la contractilidad colónica. Considerando todos estos resultados, podemos afirmar que el colon no presenta cambios dramáticos en su función al envejecer, lo que pudiera explicarse por la existencia de mecanismos fisiológicos redundantes. Estos cambios, sin embargo, generan pequeñas alteraciones de la función peristáltica, principal propulsor del contenido colónico (Cap 1) relacionadas con la velocidad y progresión de las ondas peristálticas. Esto sugiere la existencia de una redundancia funcional en el colon que asegura una función colónica preservada en el envejecimiento que no compromete la supervivencia en esta etapa de la vida.

Las diferencias del efecto de la edad en los segmentos proximal y distal tienen su explicación en los distintos patrones de oxidación que hemos descrito para dichos segmentos en animales jóvenes y envejecidos (Cap 4). Así los niveles de H₂O₂ son más elevados en el colon proximal, lo que crea un ambiente de mayor daño por procesos nocivos asociados al estrés oxidativo que explicarían el incremento de alteraciones funcionales en esta porción del colon. Paradójicamente el incremento en la [H₂O₂] coexiste con una actividad catalasa elevada comparada con la existente en el colon distal, lo que justifica que en jóvenes no existan diferencias significativas en los niveles de peroxidación lipídica (inferidos por la [MDA]). Con el envejecimiento, una mayor producción de H₂O₂ en el colon proximal, hace a las defensas antioxidantes inefectivas, aumentando el daño por peroxidación lipídica. Sin embargo, el colon distal, pese a reducir la actividad de catalasa no incrementa, sino que reduce la [H₂O₂] y la peroxidación lipídica, lo que indica que el colon distal es más resistente al deterioro por

envejecimiento. El incremento del estrés oxidativo asociado al envejecimiento conduce también a una reducción de las fluctuaciones del potencial de membrana mitocondrial, signo de alteración de la función de esta organela, como describimos en el capítulo 5. Los marcadores de inflamación cuantificados apuntan a que subyace una inflamación crónica en el tejido muscular que colaboraría en la activación de procesos apoptóticos mediados por caspasas 3y 9 que podría suponer pérdida de elementos celulares y disfunción tisular.

En consonancia con estudios previos en los que evaluamos los efectos del tratamiento a largo plazo con melatonina en el envejecimiento de la vesícula biliar y vejiga urinaria, en el colon la melatonina restaura las funciones motoras desde el nivel de mayor complejidad funcional (peristalsis) hasta el patrón motor más básico (CFEs) así como procesos subcelulares como la respiración celular y función mitocondrial proporcionando un medio interno estable al reducir los procesos de inflamación y apoptosis asociados a estrés oxidativo. Todo ello nos lleva a considerar la melatonina como una valiosa herramienta farmacológica para reducir la pérdida funcional asociada al envejecimiento.

Uno de los factores más relevantes en los mecanismos de envejecimiento es la vía de señalización que implica a la cinasa mTOR. Formando complejos con otras proteínas señalizadoras, esta proteína regula la síntesis proteica, el metabolismo, la diferenciación celular y la autofagia, todos ellos procesos implicados en el envejecimiento. Aunque, debido al efecto de sus inhibidores sobre la longevidad en roedores y modelos no mamíferos, esta vía es actualmente aceptada como elemento clave en el envejecimiento celular, apenas existen pruebas de su activación en células de individuos envejecidos (solamente existen 2 artículos previos). Nuestro estudio (Capítulo VI6) refuerza el concepto de que mTOR está activada en el envejecimiento (incluyendo la actividad de los sustratos inmediatos de mTOR) y que cambios en esta vía tienen consecuencias funcionales concretas. En concreto, en nuestro modelo de cobaya se produce una reducción en la movilización de calcio de depósitos intracelulares al menos en parte por una pérdida del efecto facilitador que sobre dicha movilización tiene la proteína FKBP12, que actúa como inhibidor de la actividad mTOR. En relación con esto, es interesante observar que la extrema variabilidad de los sistemas de regulación de los canales de liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares podría explicar la diferencia con el modelo de ratón (Capítulo V6), donde la respuesta a cafeína es potenciada por el envejecimiento (algo que además no parece explicarse por las alteraciones mitocondriales descritas en el Capítulo V5).

Dentro del envejecimiento, una de las teorías actualmente más en boga es la teoría mitocondrial-lisosomal. Esta se basa en que durante el envejecimiento se produce un paulatino aumento de mitocondrias alteradas o aberrantes en el compartimento fagolisosómico mediante el que cual normalmente las células eliminan tales mitocondrias defectuosas (mitofagia). Esto favorecería la formación de especies reactivas de oxígeno y daño oxidativo. El capítulo V5 de la presente memoria indica que en el músculo liso del colon de ratón el envejecimiento induce un aumento de la actividad basal de la ATPasa mitocondrial y una disminución de la respuesta metabólica mitocondrial a la estimulación celular, asociado a un incremento del papel de la glucólisis en la contracción. Esta alteración o desplazamiento metabólico, similar al clásico efecto Warburg de las células tumorales, es revertida junto con los parámetros mitocondriales y

contráctiles por el tratamiento a largo plazo con melatonina, salvo el incremento de la actividad glucolítica, que podría ser una adaptación ventajosa de las células en envejecimiento para mejorar el equilibrio redox (ver discusión Capítulo V). Estos cambios participan muy probablemente en la disminución contráctil provocada por el envejecimiento.

Colateralmente, nuestro estudio abre interrogantes sobre los mecanismos fisiológicos implicados en la heterogeneidad funcional de las mitocondrias, algo imposible de abordar en los estudios que emplean técnicas bioquímicas (actividad de complejos mitocondriales, daño genético y oxidativo de las mitocondrias,...), que son actualmente mayoría en el campo. Así, sería necesario explicar la respuesta hiperpolarizante a la estimulación de buena parte de las mitocondrias de células senescentes, o la significativa proporción de la red mitocondrial de células jóvenes con actividad reversa de la ATPsintasa (al posible efecto protector como reductor de la formación mitocondrial de oxidantes por desacoplamiento suave cabe oponer las serias dudas sobre la teoría del mild uncoupling).

En el contexto de los cambios mitocondriales asociados al envejecimiento es de destacar también la correlación causal con cambios funcionales descrita en el último capítulo de la presente memoria. El Capítulo VIII 8 muestra que la despolarización mitocondrial puede alterar la propagación espaciotemporal de la señal de Ca^{2+} , que es un proceso activo que requiere de la liberación de calcio desde depósitos intracelulares de una manera ordenada a partir del punto de inicio de la respuesta al estímulo celular. Además, que ese efecto sea diferencial entre dos agonistas fisiológicos descarta que la preparación de células envejecidas simplemente tenga una menor sensibilidad y actividad en todos los parámetros de la señal de calcio. Por último, en el contexto de los procesos de envejecimiento relacionados con la función mitocondrial, hay que hacer notar que el fallo progresivo de la mitofagia implica también alteraciones del compartimento endosómico-lisosomal, acerca del cual ya existe alguna descripción de aumento de volumen en células senescentes no postmitóticas, como las de nuestro modelo. Puesto que el inicio de la señal en las células acinares precisa de depósitos ácidos, esto es coherente con nuestra observación de que el envejecimiento altera la intervención de tales depósitos en la iniciación y polarización de la señal de calcio.

Conclusiones



1.- La mucosa ejerce un papel dual en el control de la motilidad colónica al potenciar contracciones espontáneas e inhibir respuestas contráctiles a agonistas y estimulación del plexo nervioso entérico. Este efecto, que se atenúa con la edad, está mediado por neurotransmisores gaseosos de carácter inhibitorio o "gasotransmisores". Esto supone un nuevo paradigma en la función de la mucosa, cuyas influencias motoras tendrían como objeto la adaptación del tránsito del colon a los procesos de secreción/absorción.

2.- El plexo submucoso sólo ejerce influencias inhibitorias edad-dependientes en contracciones espontáneas del colon. El envejecimiento cursa con una reducción en la respuesta miógena en el colon proximal, sin que apenas se modifique su respuesta neurógena, que se potencia en el colon distal al elevarse la contribución colinérgica. Estos cambios sólo se traducen en una disminución de la velocidad y propagación de la onda peristáltica en los patrones propulsivos. En un modelo murino de la enfermedad de Parkinson (PINK-1) se atenúan las señales de calcio en las varicosidades neurales sin que ello se asocie a cambios en poblaciones neuronales entéricas y/o alteraciones de la propulsión fecal. Esto sugiere una redundancia funcional en el colon que asegura un grado básico de función, incluso en situaciones críticas como envejecimiento y enfermedades asociadas.

3.- Los cambios funcionales descritos se asocian a una activación constitutiva de la vía de senescencia/longevidad regulada por m-TOR. Alteraciones funcionales de un componente regulador de esta vía conlleva a cambios en la señalización del Ca^{2+} en el animal envejecido. Asociados a estos cambios en la vía de mTOR aparecen desequilibrios en marcadores de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis que explicarían también la pérdida funcional en el colon envejecido.

4.- El envejecimiento del músculo liso de colon cursa con incremento de la actividad ATP sintasa mitocondrial, despolarización parcial de las mitocondrias y pérdida de su sensibilidad a los estímulos celulares, lo que se asocia a una mayor contribución de la glucólisis a la contracción muscular, que resulta finalmente reducida en individuos envejecidos.

5.- El tratamiento con melatonina normaliza la peristalsis del colon, el papel de la mucosa en el control de la motilidad colónica, la respuesta miógena del músculo, parámetros de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis y la función mitocondrial, apoyando su utilización para mejorar la calidad de vida a lo largo del envejecimiento.

6.- La propagación de la señal de Ca^{2+} polarizada de las células acinares del páncreas exocrino es alterada por el envejecimiento debido a cambios en la función mitocondrial y probablemente por modificaciones en la función de depósitos acídicos y de receptores de rianodina.

- 1.- The mucosal layer plays a differential role in the regulation of colon motility by potentiation of the spontaneous contractions and inhibition of the agonists- and enteric nervous system-induced contractions. This regulatory system is down-regulated by aging and is mediated by inhibitory volatile neurotransmitters or “gasotransmitters”. This role is a new paradigm in the mucous physiology, whose motor output would be aimed to adapt the colonic transit to the secretion/absorption process.
- 2.- The submucous plexus only has an age-dependent inhibitory role in the spontaneous colon contractions. Aging induces a reduction in the myogenic but not the neurogenic contractions of proximal colon, whereas it potentiates the neurogenic contraction of distal colon through an increase of cholinergic function. These changes only result in a decrease of both the velocity and the propagation of the propulsive peristaltic waves. Also, in a murine model of Parkinson’s disease Ca^{2+} signals of the neural varicosities are down-regulated without changes of the enteric neural populations nor the propulsion of fecal pellets. These observations suggest that functional redundancy ensures a basic colonic functionality, even in critical conditions such as aging and age-related diseases.
- 3.- The functional alterations reported here are associated to a constitutive activation of the mTOR senescence/longevity pathway. Functional alterations of a regulatory component of the mTOR pathway lead to Ca^{2+} signaling modifications in aged animals. These changes are accompanied by an unbalance in oxidative, inflammatory and apoptotic markers which could explain the functional impairment of aged colon.
- 4.- Aging induces in the mitochondria of colonic smooth muscle an increase of ATP synthase activity, partial depolarization and decrease of the responsiveness to cellular stimulation, associated to an shift to glycolysis during muscle contraction, which is reduced in aged individuals.
- 5- Melatonin normalizes peristalsis, the mucosal regulation of contractility, the myogenic contraction, the markers for oxidative stress, inflammation and apoptosis and the mitochondrial function, supporting its use to improve the quality of life during aging.
- 6.- Aging alters the propagation of polarized Ca^{2+} signals in pancreatic acinar cells due to modifications of the mitochondrial function and likely to changes in the function of acidic Ca^{2+} stores and ryanodine receptors.