



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

TRANSPORTE VESICULAR DIRIGIDO POR MICROTÚBULOS  
EN LA SECRECIÓN SOMÁTICA DE SEROTONINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

CARLOS EDUARDO BUSTOS SEGURA



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

TUTOR  
FRANCISCO RAFAEL FERNÁNDEZ DE MIGUEL

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno.

Bustos  
Segura  
Carlos Eduardo  
5530-6779  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
099033880

### 2. Datos del tutor

Dr  
Fernández  
De Miguel  
Francisco Rafael

### 3. Datos del sinodal 1

M en C  
Prieto  
Sagredo  
Julio Alejandro

### 4. Datos del sinodal 2

Dr  
Santamaría  
Holek  
Iván

### 5. Datos del sinodal 3

Dr  
Salceda  
Sacanelles  
Rocío

### 6. Datos del sinodal 4

Dra  
González  
Gómez  
Gertrudis Hortensia

### 7. Datos del trabajo escrito.

Transporte vesicular dirigido por microtúbulos en la secreción somática de serotonina  
78 p.  
2007

¿Quién pregunta?  
El ser humano.

¿Quién responde?...

Puede que estemos condenados,  
que no haya esperanza para nosotros,  
para ninguno de nosotros, pero, si es así,  
¡lancemos un último alarido agónico,  
espeluznante, un chillido de desafío,  
un grito de guerra! ¡Al diablo las lamentaciones!  
Que los muertos se coman a los muertos.  
Bailemos los vivos en el borde del cráter,  
una última danza agónica. ¡Pero una danza auténtica!

Henry Miller, Trópico de Cáncer

## **TRABAJO DEDICADO A:**

Mis amigos y a mi familia, siempre pienso en ustedes.

En especial a mamá por hacerme lo que soy, te extraño.

A mi hermana por estar siempre a mi lado.

A papá por orientarme en el camino de la ciencia.

A Michelle por escucharme y aconsejarme en el momento adecuado

## **AGRADECIMIENTOS**

A Francisco por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por todo lo que me ha enseñado y por ser mi maestro.

A mis compañeros de laboratorio Javier, Bruno, Citlali, Christian, Mariana, Monse, Caro, Zian, Paula, Lino, Prashant, Adriana, Ivette, Julieta, Raúl, Susana, César, Mónica

A Julio Prieto, Iván Santamaría, Hortensia González y Rocío Salceda por sus útiles críticas y comentarios acerca de mi trabajo.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> .....	1
 <b>ANTECEDENTES</b>	
LA SEROTONINA.....	3
Funciones de la serotonina.....	3
SECRECIÓN SOMÁTICA DE NEUROTRANSMISORES.....	6
Liberación somática de serotonina en la célula de Retzius.....	9
EL CITOESQUELETO Y LOS MICROTÚBULOS.....	
14	
Los microtúbulos.....	15
Dinámicas de polimerización de los microtúbulos.....	15
Proteínas asociadas a los microtúbulos.....	18
Fármacos reguladores de los microtúbulos.....	19
Inhibición de la polimerización de tubulina por colchicina.....	20
PROTEÍNAS MOTORAS INVOLUCRADAS EN	
EN EL TRANSPORTE VESICULAR .....	22
MOVILIZACIÓN VESICULAR.....	27
EXOCITOSIS Y CITOESQUELETO.....	28
SISTEMA NERVIOSO DE LA SANGUIJUELA.....	31
 <b>HIPÓTESIS</b> .....	 34
 <b>OBJETIVOS</b> .....	 35
 <b>METODOLOGÍA Y MATERIALES</b>	
PREPARACIÓN BIOLÓGICA	
Disección.....	36
Cultivo de neuronas.....	37

Tratamiento farmacológico.....	38
<b>ESTUDIO DE LA SECRECIÓN SOMÁTICA DE SEROTONINA</b>	
Tinción con FM1-43.....	38
Estimulación intracelular.....	40
Captura de imágenes.....	42
<b>ANÁLISIS DE DATOS</b>	
Análisis de los cambios en fluorescencia.....	42
Conteo de puntos fluorescentes.....	43
Análisis estadístico.....	43
<b>RESULTADOS</b>	
Cultivo de neuronas.....	44
Inducción de la secreción somática de serotonina con cafeína.....	45
Inducción de la secreción somática de serotonina con estimulación eléctrica.....	45
Secreción somática retardada.....	48
Distribución membranal de la fluorescencia.....	50
El tratamiento con colchicina reduce la secreción somática de serotonina.....	52
La endocitosis es menor en las células tratadas con colchicina.....	55
<b>DISCUSIÓN</b>	
La secreción depende de varios factores que afectan su cinética.....	58
Respuesta diferencial entre neuronas.....	60
Efecto del protocolo de estimulación.....	61
Secreción diferencial en una misma célula.....	62
Cinética promedio.....	62
¿Por qué la secreción inicial se elimina con colchicina? .....	63
Diferencia entre la exocitosis y endocitosis.....	64
Similitudes con la secreción en células endocrina.....	65

Perspectivas.....	66
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>69</b>

## **RESUMEN.**

Con este trabajo estudiamos la participación de los microtúbulos en la movilización vesicular durante la secreción somática de serotonina.

La serotonina es un neuromodulador y un neurotransmisor que regula funciones básicas como el ritmo respiratorio y en el ser humano participa en conductas sociales y trastornos complejos como la depresión. A pesar de las múltiples funciones de la serotonina, el número de neuronas y sinapsis serotoninérgicas en el sistema nervioso es muy bajo. Aunado a esto se ha mostrado que la serotonina se libera también de sitios extrasinápticos, incluido el soma celular. Esta liberación ocurre en mayores cantidades que en las sinapsis y posiblemente es la fuente de modulación de otras neuronas por una vía paracrina.

Para estudiar la relación de la secreción somática de serotonina con los microtúbulos usamos neuronas de Retzius de la sanguijuela. El soma de estas neuronas es capaz de liberar serotonina en grandes cantidades mediante exocitosis. Esta liberación depende de la frecuencia de estimulación, de la entrada de calcio a través de canales de tipo L y de la liberación de calcio intracelular inducida por calcio. Todo esto produce un movimiento dirigido de cúmulos de vesículas electrodensas que contienen serotonina desde el interior de la célula hacia la membrana plasmática y su fusión con ella. Dado que los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la movilización de vesículas aún no se han estudiado, enfocamos nuestro estudio a conocer la función de los microtúbulos en este transporte vesicular.

La exocitosis se midió como el resultado del transporte vesicular, analizando la incorporación del colorante fluorescente FM1-43 a la membrana plasmática. La exocitosis produjo un incremento en la intensidad de la fluorescencia en presencia del colorante ante

una estimulación. Para saber si la endocitosis está acoplada a la exocitosis se cuantificó el número de puntos fluorescentes endocitados por soma, después del lavado del colorante. En estas condiciones cada punto fluorescente muestra un cúmulo de vesículas endocitadas.

La secreción somática se indujo produciendo la liberación de calcio intracelular con cafeína o mediante estimulación eléctrica, usando un electrodo intracelular y aplicando trenes de diez impulsos a 20 Hz con intervalos de dos minutos. Para analizar la participación de los microtúbulos usamos el fármaco colchicina, el cual favorece su despolimerización.

En células estimuladas con un pulso de cafeína, la intensidad de fluorescencia se incrementó con una cinética logarítmica. En contraste, al estimular eléctricamente a las neuronas el aumento en la fluorescencia del soma tuvo varios componentes, con un intervalo dinámico que duró 500 segundos. En presencia de colchicina la fluorescencia no aumentó ante el mismo protocolo de estimulación eléctrica.

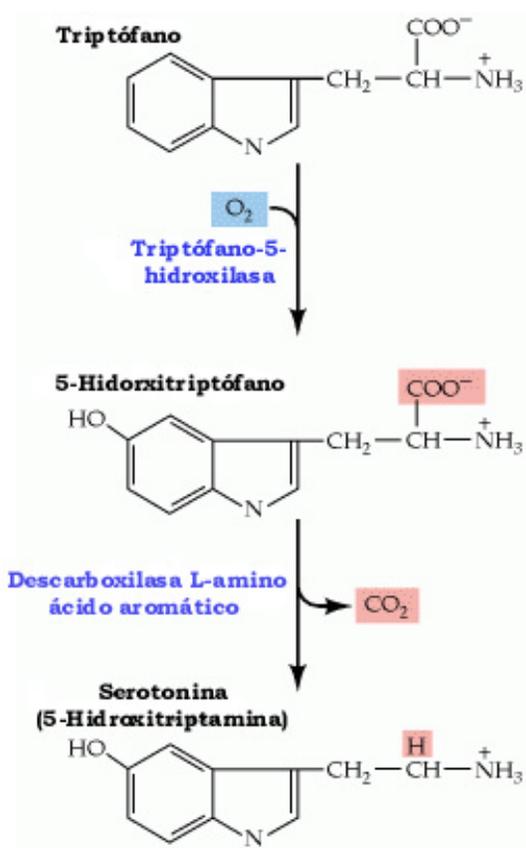
La endocitosis tuvo algunas diferencias con la exocitosis. En células tratadas con colchicina el número de puntos fluorescentes por soma fue menor que en células control. Sin embargo, la colchicina no abolió la endocitosis. En promedio las células control tuvieron  $102.3 \pm 11.55$  puntos por soma (media  $\pm$  e.s.; n=7), mientras que las células tratadas con colchicina presentaron  $60.29 \pm 8.12$  (n=7).

En conclusión, proponemos que la secreción somática es un proceso altamente regulado y dependiente de los microtúbulos. Además, la exocitosis y la endocitosis tienen diferente dependencia de los microtúbulos, lo que sugiere que estos dos procesos son independientes entre sí.

## ANTECEDENTES.

### LA SEROTONINA.

La 5-hidroxitriptamina o serotonina (Fig. 1) es una indolamina que participa en la comunicación nerviosa entre muchos tipos neuronales, sirviendo como neurotransmisor y neuromodulador, ya que además de funcionar como mensajero químico entre las neuronas, modula la integración sináptica cuando se encuentra en el medio extracelular (Ovsepián y Vesselkin, 2006).



**Figura 1.** Ruta de síntesis y estructura química de la serotonina (5-Hidroxitriptamina). Tomado de Purves, *et al.*, 2001.

### Funciones de la serotonina.

La serotonina participa en diversas actividades fisiológicas y conductuales, en animales invertebrados y vertebrados, como son el sueño, la alimentación, el aprendizaje y

la regulación de generadores de ritmos biológicos (Gaspar, *et al.* 1992; Bailey, *et al.*, 1992; Arbas y Calabrese, 1984; Sze, *et al.* 2000); en humanos se ha visto que es importante en trastornos como la ansiedad, la agresividad y la depresión (Nelson y Chiavegatto, 2001; Mann, 2003; Gross y Hen, 2004). La serotonina mantiene un ciclo de producción circadiana en la glándula pineal, siendo precursora de la melatonina, la cual regula funciones como el sueño, el reloj biológico del núcleo supraquiasmático y la reproducción estacional (Sun, *et al.* 2002).

El desarrollo de ciertas zonas cerebrales así como la ramificación y crecimiento neurítico también son regulados por la serotonina. Por ello, mutaciones en los transportadores y receptores de serotonina y en enzimas que participan en su degradación como la monoamina oxidasa (MAO), producen desórdenes en el desarrollo neurológico y por lo tanto trastornos en la conducta postnatal (Gaspar, *et al.* 1992).

La serotonina también se involucra en el aprendizaje. En *Aplysia*, el reflejo de retracción del sifón es modulado por la serotonina. Una sola aplicación de serotonina induce facilitación a corto plazo, mientras que repetidas aplicaciones pueden inducir la facilitación a largo plazo, para la que se requieren cambios transcripcionales. En ello interviene la activación de la cascada de señalización del cAMP y la creación de nuevas conexiones sinápticas (Bailey, *et al.*, 1992). En la sanguijuela la serotonina modula la excitabilidad de la interneurona S, la cual es esencial para el aprendizaje en el reflejo de contracción del cuerpo (Burrell, *et al.*, 2001). Así, el aumento en la excitabilidad de la neurona S inducida por aprendizaje es eliminado con el uso de antagonistas de serotonina. De la misma manera se puede inhibir el incremento en el reflejo de contracción inducida por sensibilización (Burrell y Sahley, 2005).

Diversos generadores de patrones rítmicos, como el ritmo respiratorio, son regulados por la serotonina (para revisión ver Feldman, *et al.*, 2003). Existen neuronas serotoninérgicas que son sensores del CO<sub>2</sub> (Richerson, 2004) y modifican el generador del ritmo durante la hipoxia. La serotonina también es esencial para la generación de los movimientos rítmicos del bigote de los roedores, modulando la actividad de las motoneuronas del área facial (Hattox, *et al.*, 2003). En la sanguijuela, la serotonina es un neurotransmisor principal en la modulación del generador del patrón central (GPC) de nado (para una revisión ver Kristan, *et al.*, 2005), el que puede ser iniciado ya sea por excitación sináptica de neuronas activadoras del GPC a partir de neuronas serotoninérgicas (Nusbaum, 1986; Nusbaum y Kristan, 1986), o por vía paracrina al estimular a las neuronas de Retzius (Willard, 1981). La serotonina y/o la excitación de las neuronas de Retzius también incrementan la frecuencia del generador del ritmo cardíaco en la sanguijuela (Arbas y Calabrese, 1984).

En el gusano *Caenorhabditis elegans*, la asociación entre el olor y el alimento es producto de un proceso celular de aprendizaje cuya neurotransmisión es mediada por serotonina (Sze, *et al.* 2000; Nuttley, 2002). La ingesta puede reducir la sensibilidad al olor por medio de un mecanismo serotoninérgico, dado que la reducción de serotonina disminuye esta sensibilidad (Chao, *et al.*, 2004).

La serotonina también participa en el establecimiento de la dominancia, principalmente en machos. Al ser inyectada en langostas, la serotonina provoca una postura semejante a la adoptada por individuos dominantes (Livingstone, *et al.*, 1980). Esto se debe a que actúa sobre circuitos neuronales del sistema nervioso central que causan la flexión de los músculos involucrados en dicha postura (Harris-Warrick y Kravitz, 1984; Kravitz, 1988). Por otra parte, una baja concentración de metabolitos precursores de serotonina en el

fluido cerebroespinal y niveles bajos de serotonina se relacionan con comportamiento impulsivo y alta agresividad en primates y mamíferos de laboratorio. En el efecto de los niveles bajos de serotonina sobre la agresión participan otras sustancias químicas como son las hormonas esteroides, vasopresina, histaminas, sustancia P, óxido nítrico y la MAO-A (Nelson y Chiavegatto, 2001).

A pesar de la gran variedad de funciones en las que participa la serotonina, las neuronas que la contienen se encuentran en una proporción muy baja en el sistema nervioso. En el cerebro de los mamíferos la mayor parte de las neuronas serotoninérgicas se localizan en zonas pequeñas como el rafe dorsal y la substantia nigra pars reticulata (Siegel, *et al.*, 1999). En animales invertebrados, como la sanguijuela, existen entre siete y nueve neuronas serotoninérgicas por ganglio (Lent, *et al.*, 1979). Las conexiones sinápticas que usan serotonina como mensajero químico también son pocas (Nicholls, 1994). Lo anterior, aunado a que se han encontrado receptores y transportadores de serotonina en sitios extrasinápticos, ha llevado a la idea de que la serotonina puede ser liberada de sitios extrasinápticos como el cuerpo celular (Bunin y Wightman, 1999; De-Miguel y Trueta, 2005). La primera demostración directa de la secreción somática de serotonina proviene de los trabajos de Trueta *et al.* (2003, 2004).

### **SECRECIÓN SOMÁTICA DE NEUROTRANSMISORES.**

La comunicación neuronal mediada por neurotransmisores ha sido generalmente comprendida como la liberación de mensajeros químicos en la sinapsis ante la excitación eléctrica. Sin embargo, múltiples trabajos recientes han demostrado la existencia de la secreción de neurotransmisores en el soma neuronal, tanto en invertebrados como en vertebrados (Chen, *et al.*, 1995; Huang y Neher, 1996; Zaidi y Matthews, 1997; Jaffe, *et al.*,

1998; Trueta, *et al.*, 2003; Soldo, *et al.*, 2004). Este mecanismo de liberación es más parecido al de una liberación endocrina que al de la comunicación sináptica clásica (De-Miguel y Trueta, 2005). Esta secreción permite que el neurotransmisor fluya por los espacios extracelulares y afecte a las células vecinas al sitio de la secreción y que posean receptores para la sustancia (Bunin y Wightman, 1999).

La primera demostración de la secreción somática de neurotransmisor proviene de neuronas espinales en cultivo de la rana *Xenopus*, que secretan acetilcolina. Esto se demostró usando un parche de membrana muscular con receptores de acetilcolina, colocado cerca del soma neuronal. La liberación de acetilcolina del soma se detectó al aplicar estimulaciones eléctricas prolongadas y es dependiente de calcio (Sun y Poo, 1987). La acetilcolina también es secretada por el soma del ganglio ciliar embrionario del pollo, a partir de vesículas claras y en zonas activas específicas (Nguyen y Sargent, 2002).

El ganglio simpático de la rata puede secretar catecolaminas y diversos péptidos a partir de vesículas de núcleo denso, tanto en el soma, como en dendritas y terminales nerviosas. La exocitosis desde el soma se puede dar en respuesta a una despolarización o a la aplicación de agonistas para receptores nicotínicos o muscarínicos ubicados en el soma, mientras que en terminales nerviosas sólo es provocada por agonistas muscarínicos (Zaidi y Matthews, 1997). Las neurohormonas oxitocina y vasopresina también son liberadas por exocitosis somática en las neuronas magnocelulares supraópticas del hipotálamo de la rata (Moss, *et al.*, 1984). Esta liberación es dependiente de calcio y se facilita con la aplicación de pulsos a altas frecuencias (Soldo, *et al.*, 2004).

Hay también varios ejemplos de exocitosis de dopamina por el soma neuronal de invertebrados y vertebrados. Dicha liberación ocurre en la célula mayor dopaminérgica del caracol, en respuesta a una despolarización y es dependiente de calcio (Chen, *et al.*, 1995);

en neuronas de la sustancia negra de la rata a partir de una despolarización o de la aplicación de glutamato (Jaffe, *et al.*, 1998), y en neuronas dopaminérgicas aisladas de la retina de rata, donde la exocitosis somática de dopamina es inducida por potenciales de acción espontáneos y rítmicos. En estas últimas la liberación es regulada por receptores extrasinápticos (Puopolo, *et al.*, 2001).

En las neuronas del ganglio de la raíz dorsal la liberación de sustancia P del cuerpo celular depende de calcio. La exocitosis en estas células proviene de vesículas grandes de núcleo denso y es similar a la secreción en células endocrinas. Por ejemplo, requiere concentraciones de calcio de 3-10  $\mu\text{M}$  (Huang y Neher, 1996), que son entre 10 y 100 veces menores a las requeridas para la secreción en la sinápsis gigante del calamar (Llinás, *et al.*, 1992).

La secreción de serotonina en el soma neuronal de la célula metacerebral del gasterópodo *Aplysia californica* ha sido estudiada combinando las técnicas de electroforesis capilar con la fluorescencia nativa inducida por láser. La serotonina liberada por el soma ante una estimulación de 2 minutos representa el 4% del total de la serotonina contenida en el soma, que está calculada en  $800 \pm 85$  fmoles (Miao, *et al.*, 2003). En la célula de Retzius de la sanguijuela la secreción somática de serotonina se da a partir de vesículas de núcleo denso (Bruns, *et al.*, 2000) ante la estimulación a altas frecuencias y es dependiente de la entrada de calcio a través de canales de tipo L (Trueta, *et al.*, 2003).

Hay características comunes en los diferentes sistemas en los que se ha estudiado la secreción somática de neurotransmisores. Podemos destacar que es dependiente de calcio, principalmente por la entrada por canales de tipo L. Las aminas biogénicas y péptidos son secretados generalmente por vesículas electrodensas. Puede darse de una forma más lenta

que la secreción sináptica y ser más prolongada; y la cantidad de neurotransmisor liberado es mucho mayor que las sinápticas.

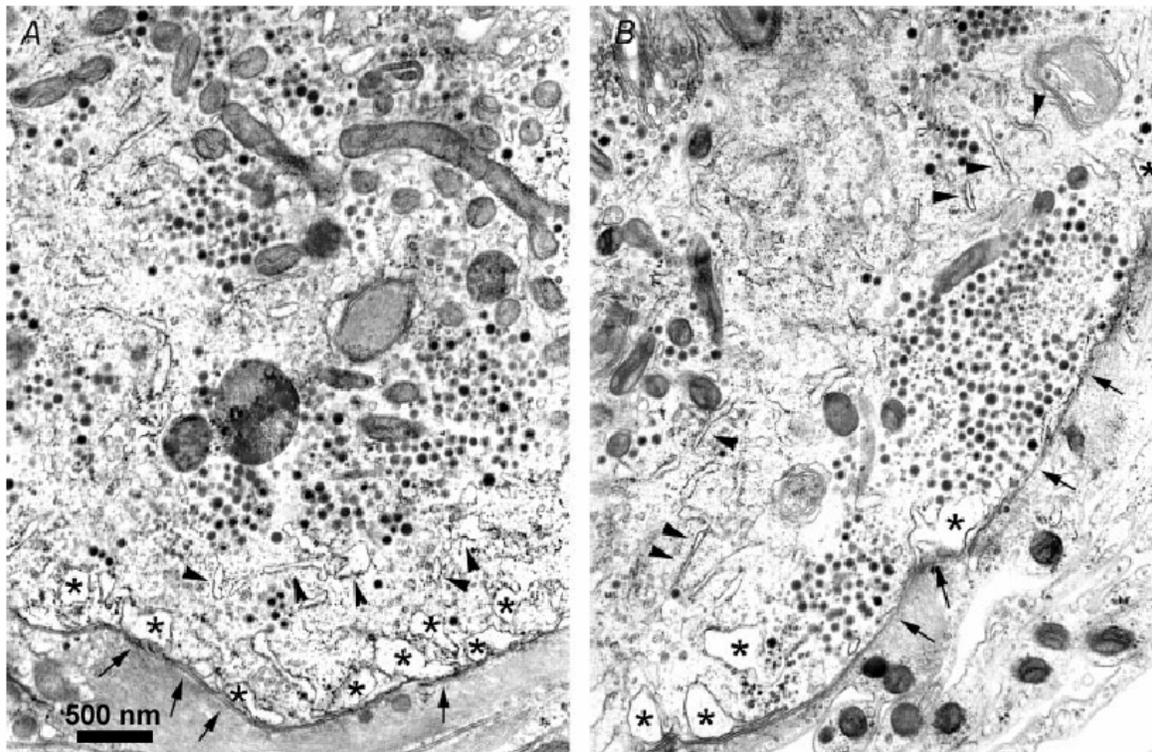
En los trabajos pioneros se han descrito propiedades fundamentales de la exocitosis somática, sin embargo faltan por estudiar muchas de sus características. Por una parte están las preguntas de si los neurotransmisores disueltos en el medio externo activan receptores extrasinápticos funcionales en otras células y por qué mecanismos se lleva a cabo la movilización de vesículas. Por otra parte, el hecho de que se haya descrito este tipo de secreción en neuronas de invertebrados y vertebrados parece indicar que se trata de un mecanismo de comunicación nerviosa con un alto grado de conservación evolutiva, y que si bien es un fenómeno poco conocido, podría estar extendido en toda la escala filogenética.

### **Liberación somática de serotonina en la célula de Retzius.**

La serotonina es el principal neurotransmisor en las células de Retzius, y tal vez el único (Rude, *et al.*, 1969). Estas neuronas contienen más del 50% de la serotonina presente en la sanguijuela. El neurotransmisor está contenido en vesículas sinápticas claras y en vesículas grandes de núcleo denso, tanto en el soma como en sinapsis (Kuffler, *et al.*, 1987). El contenido de serotonina en las vesículas electrodensas es mucho mayor debido a su tamaño, por lo que estos organelos son capaces de liberar una mayor cantidad de serotonina que las vesículas claras, con un periodo de secreción más prolongado. Sin embargo, la concentración de serotonina en ambos tipos de vesículas es similar (Bruns, *et al.*, 2000).

La distribución de las vesículas en la célula de Retzius ha sido esclarecida con el uso de microscopía electrónica. Las vesículas claras están en las terminales de la neurona, mientras que las vesículas de núcleo denso están tanto en el axón como en el cuerpo

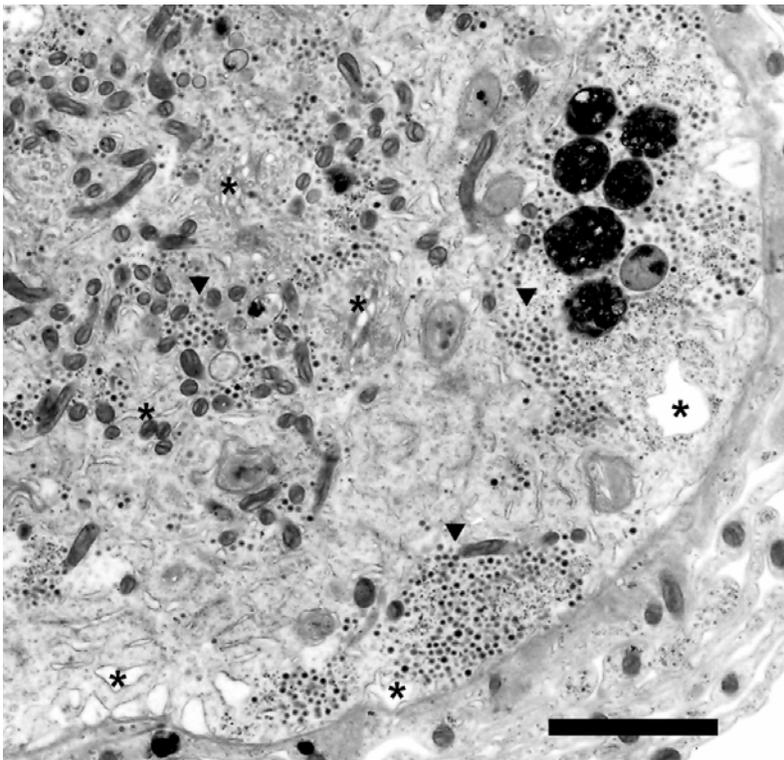
celular. Es por esto que la serotonina puede ser secretada en la terminal nerviosa por ambos tipos de vesículas (Bruns y Jahn, 1995) y en el soma por vesículas electrodensas (Bruns, *et al.*, 2000). En el muñón, las vesículas electrodensas rodean a los paquetes de vesículas claras (Bruns y Jahn, 1995), mientras que en el soma se agrupan en cúmulos. En reposo, las vesículas de núcleo denso están alejadas de la membrana plasmática (Fig. 2A). Sin embargo, después de estimular a altas frecuencias las vesículas electrodensas aparecen adyacentes a la membrana (Fig. 2B), desplazando a fragmentos de retículo endoplásmico (Trueta, *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Micrografías electrónicas del soma de la neurona de Retzius. A) Disposición de los cúmulos de vesículas electrodensas en el soma de una neurona estimulada a 1 Hz, éstos se encuentran lejos de la membrana plasmática. El retículo endoplásmico se ubica entre la membrana y los cúmulos vesiculares. B) Los cúmulos vesiculares en una célula estimulada a 20 Hz están adyacentes a la membrana y rodeados por retículo endoplásmico. Flechas, membrana plasmática. Cabezas de flecha, retículo endoplásmico rugoso. Asterisco, retículo endoplásmico. Tomado de Trueta, *et al.*, 2004.

Mientras que la liberación sináptica de serotonina se induce con potenciales de acción únicos o con trenes de baja frecuencia, la exocitosis en el soma es producida por trenes de alta frecuencia con una estimulación óptima a 20 Hz y por la entrada de calcio a través de canales de tipo L (Trueta, *et al.*, 2003), lo que induce la liberación de calcio de las pozas internas (Trueta, *et al.*, 2004). En estos casos la secreción se midió con el colorante FM1-43, cuantificando la endocitosis como una medida indirecta de la exocitosis.

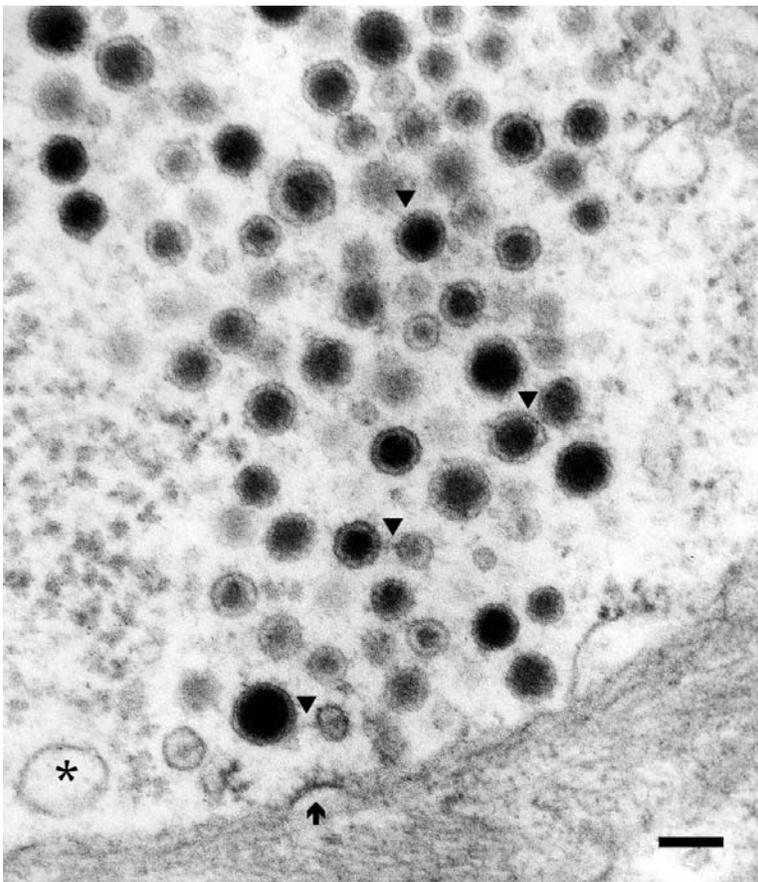
Con base en esto, se ha planteado el siguiente esquema para describir la secreción somática que integra esta información. La estimulación abre los canales de calcio de tipo L a altas frecuencias en la membrana del cuerpo celular. La entrada de calcio activa la liberación del calcio de las reservas del retículo endoplásmico, mientras que el calcio facilita la movilización de los cúmulos de vesículas electrodensas hacia la membrana y la fusión vesicular. Sin embargo, faltan por conocer los mecanismos por los cuales se lleva a cabo dicha movilización.



**Figura 3.** Micrografía del soma de la neurona de Retzius. Los cúmulos vesiculares y el retículo endoplásmico se ubican a diferentes distancias de la membrana. Cabezas de flecha, cúmulos de vesículas electrodensas. Asteriscos, retículo endoplásmico. La barra mide 2  $\mu$ m. (De-Miguel, F. F., no publicado)

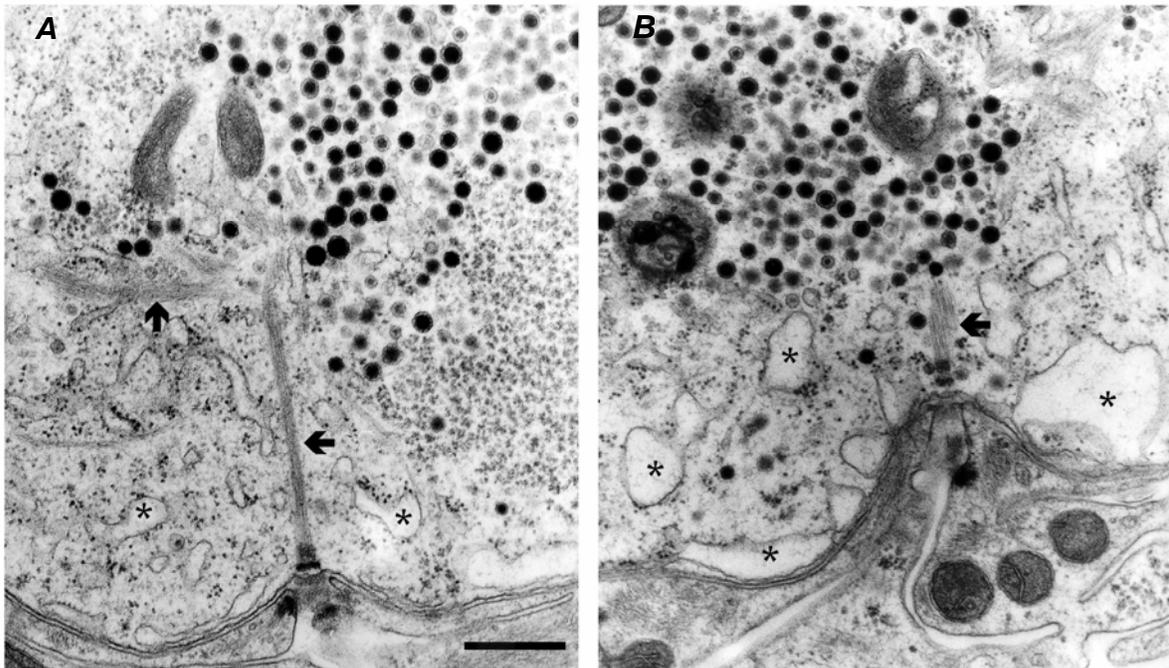
Los cúmulos multivesiculares están distribuidos en el soma de la neurona de Retzius a distintas distancias de la membrana plasmática (Fig. 3). Lo mismo se puede observar con el retículo endoplásmico. Al parecer los cúmulos vesiculares adyacentes a la membrana están listos para liberarse, mientras que los cúmulos situados entre la membrana y el núcleo necesitan estimulaciones intensas o prolongadas para alcanzar la membrana. De esta manera los cúmulos forman niveles de vesículas que pueden compararse con las pozas liberables y de reserva existentes en las terminales nerviosas.

También hay evidencias morfológicas de que la movilización de los cúmulos vesiculares podría ser guiada por el citoesqueleto. Dichas evidencias provienen de la microscopía electrónica, con la que se han observado estructuras fibrilares que unen a las vesículas electrodensas entre sí (Fig. 4). Dado que las vesículas siempre están organizadas en cúmulos, puede que estas fibras sean las encargadas de dar cohesión al conjunto.



**Figura 4.** Cúmulo de vesículas electrodensas cercano a la membrana en una neurona de Retzius estimulada a 20 Hz. Cabezas de flecha, estructuras fibrilares asociadas a las vesículas. Flecha, posible fusión vesicular. Asterisco, retículo endoplásmico. La barra mide 100 nm. (De-Miguel, F. F., en preparación)

Además, los paquetes de vesículas electrodensas están asociados a manojos de fibras de un grosor similar al de los microtúbulos y estas fibras se unen en su extremo distal a la membrana plasmática (Fig. 5; De-Miguel, F. F., en preparación), generando una posible vía por la cual los cúmulos vesiculares podrían ser dirigidos hacia la membrana plasmática. Así también, las vesículas endocitadas son conducidas hacia el interior de la célula y agrupadas en cuerpos multivesiculares, lo cual sugiere que también requieren de un transporte dirigido para ser degradadas o reutilizadas. Dado lo anterior, este trabajo pretende esclarecer la función de los microtúbulos en la movilización de los cúmulos de vesículas electrodensas durante la secreción somática de serotonina. En la siguiente sección se describen las características y funciones de los microtúbulos para comprender cómo se relacionan éstos con el transporte vesicular.



**Figura 5.** Micrografías de cúmulos vesiculares en neuronas de Retzius estimuladas a 1 Hz (A) y a 20 Hz (B). Se observan estructuras fibrilares que asocian a los cúmulos con la membrana plasmática, formando un aparente sitio activo de exocitosis. Flechas, fibras de un grosor similar al de los microtúbulos. Asterisco, retículo endoplásmico. La barra mide 400 nm. Nótese las diferentes distancias a la membrana. (De-Miguel, F. F., en preparación).

## **EL CITOESQUELETO Y LOS MICROTÚBULOS.**

Las células tienen una gran plasticidad física que les permite mantener su forma o cambiarla ante ciertas situaciones. Su interior constituye un ambiente en el cual sus componentes se encuentran en un cambio constante entre diferentes estados estructurales y funcionales. Así, en la célula se realizan funciones que necesitan movilidad o traslado de materiales de un lugar a otro y que requieren de un soporte o de un elemento que proporcione rigidez y estabilidad al entorno. El citoesqueleto constituye el conjunto de proteínas fibrilares que realiza funciones de soporte estructural y a su vez es el medio de transporte de otros componentes celulares y de la célula misma.

El citoesqueleto está formado por una variedad de proteínas que pueden polimerizarse y formar fibras, estas proteínas forman los microfilamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios (Alberts, *et al.*, 2002). La actina es un monómero del cual se pueden encontrar hasta 6 tipos, dependiendo la especie. Al polimerizarse estos monómeros forman fibras conocidas como microfilamentos de un diámetro aproximado de 8 nm. La tubulina es un dímero formado por dos proteínas denominadas  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina que al polimerizarse forman fibras huecas (de ahí su parecido con los tubos) conocidas como microtúbulos, éstos tienen unos 25 nm de grosor (Dent y Gertler, 2003). También se ha encontrado una amplia gama de proteínas que conforman fibras en distintos tipos celulares y por su tamaño entre los microfilamentos y los microtúbulos se conocen como filamentos intermedios cuyo diámetro es de 8-10 nm (Stewart, 1993).

## **Los microtúbulos.**

Los microtúbulos están compuestos de trece hileras de protofilamentos, formados por dímeros de tubulina. Los dímeros se asocian intercalando una subunidad  $\beta$ -tubulina con otra  $\alpha$ -tubulina, de manera que cada protofilamento tiene una dirección. Dado que los protofilamentos se orientan en paralelo hacia la misma dirección, los microtúbulos poseen polaridad (Borisy, 1978).

En la dirección de la subunidad  $\beta$ -tubulina está el extremo “más”, en el cual hay más procesos de polimerización, es decir, donde hay una tendencia al crecimiento del microtúbulo (Nogales, *et al.* 1998). En el extremo “menos”, que se encuentra en dirección a la subunidad  $\alpha$ -tubulina, la tendencia es opuesta, dándose con mayor facilidad la despolimerización si no está estabilizado. Aunque estas tendencias permiten identificar la polaridad del microtúbulos, la polimerización y despolimerización ocurren en ambos extremos (Bergen y Borisy, 1980).

El extremo menos normalmente está estabilizado en el centro organizador de microtúbulos (MTOC, del inglés MicroTuble Organizing Center), que en muchas células se conoce como centrosoma (Rose, *et al.*, 1993). El MTOC evita que el extremo menos se despolimerice y con eso se desintegre el microtúbulo. En algunos tipos celulares, como las neuronas, los microtúbulos no permanecen anclados al centrosoma y pueden ser estabilizados por centros organizadores en la periferia de la célula.

## **Dinámica de polimerización de los microtúbulos.**

El hecho de que en el extremo más (orientado hacia la subunidad  $\beta$ -tubulina) el crecimiento se da con mayor frecuencia, se ha explicado por el aporte de energía de la molécula GTP (guanosín trifosfato) al ser hidrolizada. La  $\alpha$ -tubulina y la  $\beta$ -tubulina están

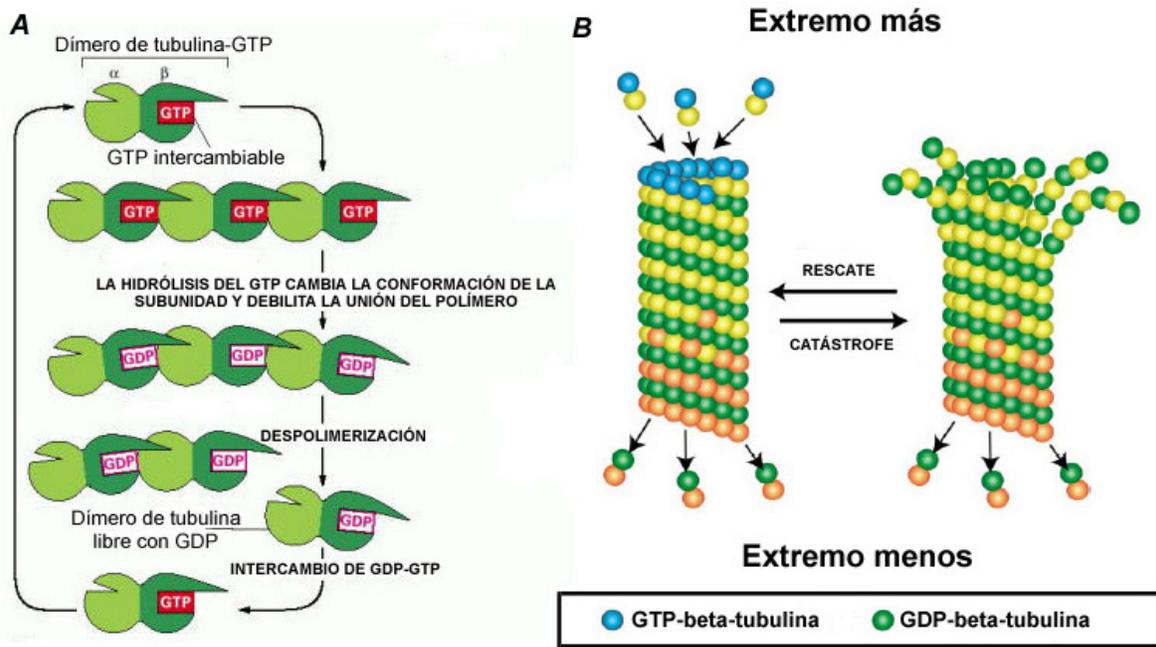
asociadas a una molécula de GTP. En la  $\alpha$ -tubulina el GTP no puede ser intercambiado ni hidrolizado. En cambio, la  $\beta$ -tubulina se puede unir a GTP libre, siendo ésta la forma en la que el dímero puede ser añadido con mayor facilidad al microtúbulo. Después de un tiempo el GTP se hidroliza convirtiéndose en GDP (guanosín difosfato). Los dímeros con GTP son más estables en el microtúbulo que los dímeros con GDP (Mitchinson, 1993). En la figura 6A se esquematizan los ciclos de hidrólisis del GTP y el intercambio GDP-GTP en la subunidad  $\beta$ -tubulina.

De esta manera en el extremo más se puede formar un “casquete” con dímeros de tubulina asociados a moléculas de GTP que recubren los dímeros hidrolizados, dando mayor estabilidad al microtúbulo (Fig. 6B). Entonces, durante el crecimiento, la tasa de polimerización tiene que ser más rápida que la de hidrólisis del GTP.

No obstante, el extremo más también puede acortarse. Cuando la tasa de polimerización es más lenta que el tiempo que tarda el GTP en hidrolizarse, el casquete de  $\beta$ -tubulina con GTP se comienza a transformar en una región de  $\beta$ -tubulina con GDP. Esta modificación vuelve inestable al extremo más y facilita la despolimerización. Este período se conoce como “catástrofe” y puede ocasionar que el microtúbulo se desintegre por completo. La catástrofe puede ser compensada con un período posterior de “recuperación”, en el cual la tasa de polimerización vuelve a aumentar. El microtúbulo puede mantenerse en equilibrio con períodos alternados de catástrofe y recuperación (Fig. 6B), dicho estado se conoce como inestabilidad dinámica (Mitchinson y Kirschner, 1984).

La inestabilidad dinámica tiene consecuencias en diversas funciones celulares. Por ejemplo, los microtúbulos pueden extenderse y retraerse en períodos relativamente cortos (Holy y Leibler, 1994), de forma tal que los microtúbulos que se desintegraron pueden ser sustituidos casi inmediatamente por otros nuevos. Por otra parte, los microtúbulos irradian

del MTOC hacia todas las partes de la célula. Pero muchas células están polarizadas, así los microtúbulos crecen más hacia ciertas regiones de la célula, mientras que en el lado opuesto los microtúbulos son más cortos.



**Figura 6.** Dinámica de polimerización de los microtúbulos. (A) Modelo de las consecuencias de la hidrólisis del GTP para la polimerización de tubulina. La presencia de tubulina-GTP en el extremo del microtúbulo lo hace más rígido y favorece la polimerización de tubulina. La hidrólisis del GTP debilita al microtúbulo y se desprenden dímeros de tubulina. La subunidad  $\beta$ -tubulina en el dímero libre puede intercambiar el GDP por GTP y volver a agregarse al microtúbulo. Tomado de Alberts, *et al.*, 2002. (B) Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. El microtúbulo se forma por dimeros de tubulina con subunidades  $\alpha$  (amarillo) y  $\beta$ . La subunidad  $\beta$  puede asociarse a GDP (verde) o a GTP (azul). En el extremo más se da un proceso de catástrofe cuando se pierde el casquete de tubulina-GTP y hay rescate cuando se forma de nuevo el casquete. Nótese la curvatura de los protofilamentos al hidrolizarse el GTP. Tomado de Dent y Gertler, 2003.

La unión interlateral de los protofilamentos que permite la formación del cilindro, depende de la fuerza con la que los dímeros de tubulina interactúan entre sí. Así, la hélice H3 de una proteína de tubulina se une con el asa M de la tubulina adyacente. Se ha sugerido

que la hidrólisis de GTP provoca un cambio conformacional en la hélice H3, dado que presenta una topología similar a la de las GTPasas tradicionales (Downing y Nogales, 1999). Este cambio podría debilitar la fuerza de unión de las proteínas contiguas.

Al parecer la fuerza de unión lateral de los dímeros unidos a GTP sería más fuerte que la fuerza existente al haber hidrólisis. Dado que la  $\alpha$ -tubulina está unida a GTP, la interacción con la  $\alpha$ -tubulina próxima no es afectada, mientras que las interacciones entre las subunidades de  $\beta$ -tubulina sí se modificarían por el intercambio GTP-GDP. La hidrólisis de GTP también favorece que los dímeros de tubulina adopten una forma curva, a diferencia de la forma recta que presentan cuando están unidos a GTP (Wang y Nogales, 2005). La curvatura de los dímeros favorece el enrollamiento de los protofilamentos, con su consecuente separación (Fig. 6B). De hecho, al purificar tubulina unida a GDP, ésta se polimeriza en forma de anillos dobles de 38 nm de diámetro (Díaz, *et al.*, 1994).

### **Proteínas asociadas a los microtúbulos.**

Uno de los factores que modifican a los microtúbulos son las proteínas que se unen a ellos, probablemente alterando las características de la inestabilidad dinámica. Dichas proteínas se conocen como MAP (del inglés Microtubule-Associated Protein) y actúan principalmente estabilizando a los microtúbulos o uniéndolos con otras proteínas. Se conocen dos grupos de MAP's: aquellas con un alto peso molecular, conocidas como proteínas HMW (del inglés High Molecular Weight) y las proteínas tau. Las primeras tienen un peso molecular de 200 000 a 300 000 daltons y las últimas de entre 55 000 y 62 000 daltons (Alberts, *et al.*, 2002).

Las MAP's se componen de dos dominios, uno que se une al microtúbulo y otro que se asocia con otros componentes celulares. La estabilización la proporcionan

principalmente al unir uno de sus dominios a varias proteínas de tubulina. Las proteínas tau se han encontrado principalmente en neuronas y se cree que son las responsables de mantener extendidos los procesos neuríticos, estabilizando a los microtúbulos alejados del soma celular. Así, una neurita en crecimiento estará siendo impulsada por el crecimiento de microtúbulos. Por el contrario, la retracción de neuritas sería acompañada por la despolimerización de los microtúbulos, ocasionada por una disminución en la tasa de polimerización.

Con la revelación de la estructura del dímero de tubulina por cristalografía (Nogales, *et al.* 1998) se sabe ahora que la regulación de la inestabilidad dinámica puede darse por cualquiera de los tres dominios funcionales de la proteína. Estos son los sitios de unión a GTP, a proteínas asociadas y a drogas, de éstas últimas se hablará a continuación.

### **Fármacos reguladores de los microtúbulos.**

Existe toda una gama de fármacos que intervienen en la dinámica de polimerización de las proteínas del citoesqueleto. Hay una variedad de proteínas que pueden modificar las propiedades de crecimiento de los microtúbulos. De hecho, una buena parte del conocimiento acerca de los microtúbulos se ha obtenido a partir del efecto que tienen ciertos fármacos sobre ellos.

Al unirse y afectar a los microtúbulos, estos fármacos son útiles para la interrupción de la mitosis, provocando la muerte celular y dañando principalmente a las células con una división celular anormal. Estos fármacos se han usado comúnmente como agentes anticancerígenos. Incluso se considera que los microtúbulos han sido el mejor blanco para el tratamiento en la mayoría de los tumores cancerígenos (Jordan y Wilson, 1998). Por ello,

la investigación sobre los microtúbulos y los fármacos que reaccionan con ellos han sido objeto de un sinnúmero de investigaciones.

Los fármacos que actúan sobre la tubulina se unen a distintos sitios de ella, inhibiendo su polimerización o estabilizando a los microtúbulos (revisado en Wilson *et al.* 1999 y Jordan 2002). Los principales fármacos que inhiben la polimerización se unen a dos sitios distintos de la subunidad  $\beta$ -tubulina: el sitio vinca y el sitio de colchicina. Al sitio vinca se unen los alcaloides del grupo vinca como la vinblastina, la vinflunina y la vinorelbina. Entre los fármacos que se unen al sitio de colchicina, están la propia colchicina y el nocodazol (Vazquez, *et al.* 1997). Las drogas que estabilizan las dinámicas de los microtúbulos sin producir despolicimerización se asocian a la subunidad  $\beta$ -tubulina en el sitio del taxol. Algunos ejemplos de estos fármacos son el taxol y el taxotere (Jordan, 2002).

La colchicina (Fig. 7A) fue una de las primeras drogas usadas debido a sus efectos antimitóticos. Cerca de 30 años después se demostró que la colchicina interactúa con la tubulina (Borisy y Taylor, 1967) afectando la polimerización de los microtúbulos. Estos trabajos pioneros han sido útiles para elucidar las propiedades y funciones fundamentales de la tubulina y de los microtúbulos. Sin embargo, el uso de la colchicina ha sido restringida para tratamientos anticancerígenos por su alta toxicidad, aunque se han puesto a prueba otros fármacos que se unen al sitio de unión de colchicina de la tubulina (Jordan, 2002).

### **Inhibición de la polimerización de tubulina por colchicina.**

La colchicina se une con el heterodímero de tubulina, muy probablemente en la interfase de los monómeros, del lado interno del microtúbulo (Downing y Nogales, 1999). El sitio de unión potencial al anillo A de la colchicina se ha identificado como un residuo

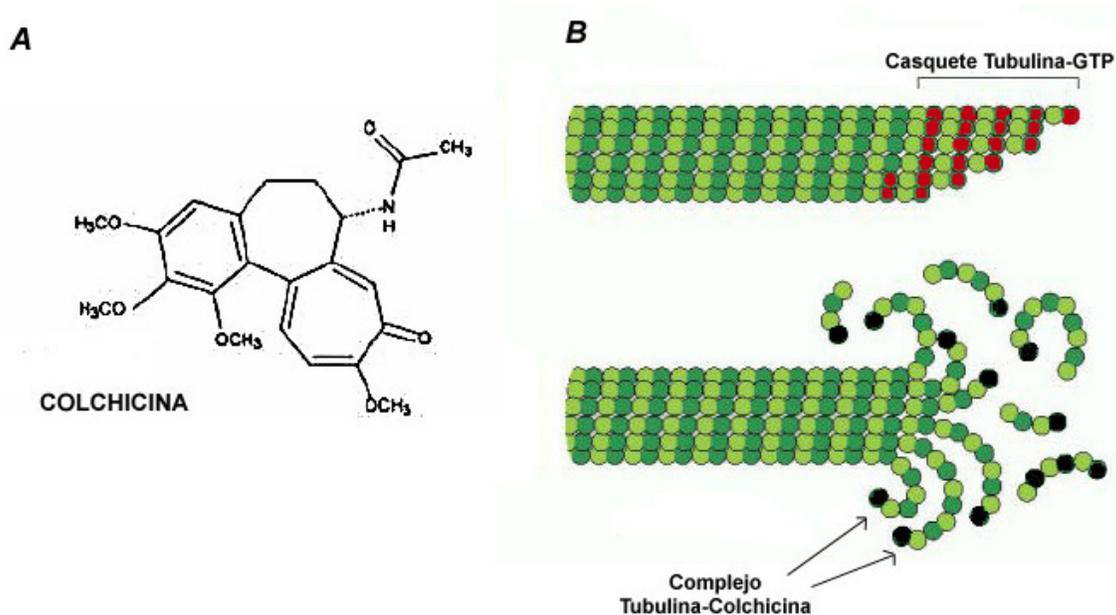
de cisteína en la subunidad  $\beta$  (Bai, *et al.*, 1996). La interacción de la colchicina con dicho sitio induce la formación de un complejo tubulina-colchicina (TC), mediante una reacción pobremente reversible que provoca un cambio conformacional de la tubulina.

La colchicina inhibe la polimerización de los microtúbulos aun cuando su concentración es menor que la de la tubulina libre. Esto indica que su efecto no es debido a la unión con todos los dímeros de tubulina libre, sino que se une a los extremos de los microtúbulos. Sin embargo, la tubulina se une con poca afinidad a los extremos de los microtúbulos (Skoufias y Wilson, 1992). Por lo tanto, la colchicina se debe unir primero a la tubulina libre y formar el complejo TC.

El complejo TC es capaz de unirse al microtúbulo y de disminuir la capacidad de la tubulina libre de añadirse al polímero (Fig. 7B; Margolis y Wilson, 1977). Los complejos TC, regulan el intercambio de tubulina en los extremos del microtúbulo, incluso a concentraciones más bajas que las necesarias para provocar el desensamble de los microtúbulos. De hecho al unirse de una a dos moléculas del complejo TC por microtúbulo, se frena la tasa de incorporación de tubulina en un 50% (Skoufias y Wilson, 1992).

La mayor parte de estudios de la interacción de la colchicina con los microtúbulos han utilizado microtúbulos ensamblados a partir de tubulina aislada, es decir *in vitro*. Dado que la inestabilidad dinámica puede ser regulada por fármacos, es de suponerse que dicha regulación tenga su origen en la interacción de los microtúbulos con moléculas presentes en el entorno, encargadas de regular su dinámica de polimerización. Entonces, posiblemente los efectos de la colchicina sobre los microtúbulos pueden ser modificados por factores endógenos. Las proteínas MAP, incluyendo las proteínas tau y HMW, pueden inhibir la unión de la colchicina a la tubulina libre mediante competencia (Nunez, *et al.* 1979). Sin embargo, la efectividad de la colchicina *in vivo* para desensamblar a los microtúbulos ha

sido probada, a pesar de la interacción del fármaco con proteínas endógenas, evidenciando la disociación de la tubulina del aparato mitótico (Salmon, *et al.*, 1984).



**Figura 7.** La colchicina afecta la dinámica de polimerización de los microtúbulos. (A) Modelo de la estructura química de la colchicina. (B) Los microtúbulos están en una inestabilidad dinámica con dímeros de tubulina compuestos por una subunidad  $\alpha$  unida a GTP (verde claro) y una subunidad  $\beta$  que se puede unir a GTP (rojo) o a GDP (verde oscuro). La formación del casquete tubulina-GTP favorece la agregación de más dímeros de tubulina. La colchicina se une a la subunidad  $\beta$  del dímero de tubulina formando complejos tubulina-colchicina (TC) (en negro). Los complejos TC al unirse al extremo más del microtúbulo favorecen la despolimerización y disminuyen la agregación de más dímeros de tubulina, modificando la inestabilidad dinámica.

### PROTEÍNAS MOTORAS INVOLUCRADAS EN EL TRANSPORTE VESICULAR.

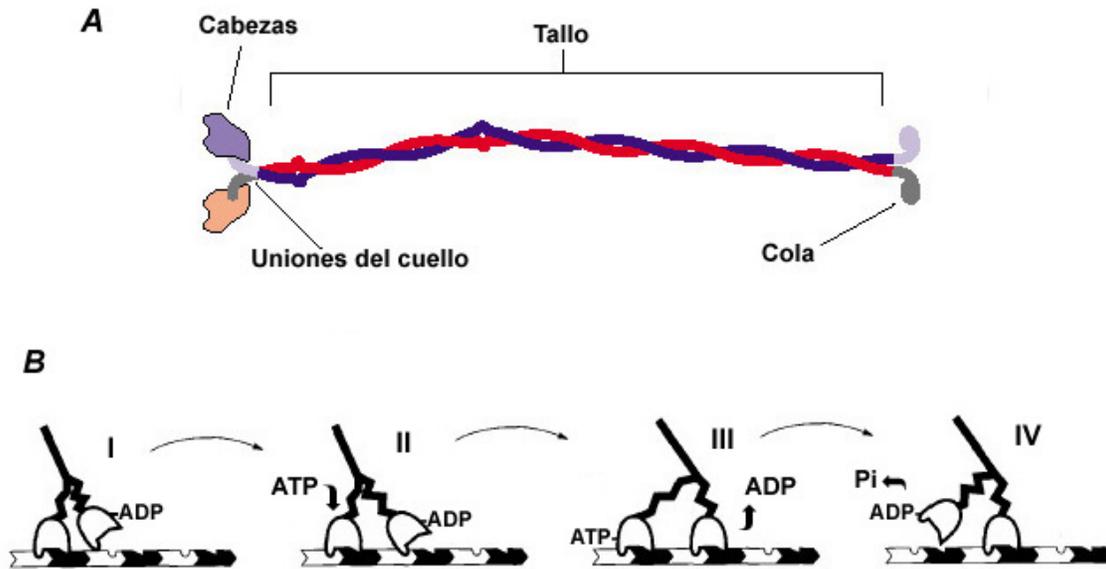
Los microtúbulos forman una red que puede usarse como un complejo de rieles para el transporte de materiales celulares en dos direcciones: del MTOC o el centro de la célula hacia la membrana celular, o de ésta hacia el MTOC. Así, en el caso de la secreción, las vesículas que participan en la exocitosis se desplazan preferencialmente hacia la membrana

celular y las vesículas que fueron endocitadas y se dirigen a un reciclaje o a una degradación usan la segunda dirección (Goldstein y Yang, 2000).

Existen proteínas motoras cuya cinética depende de ATP (adenosín trifosfato), que son intermediarias entre la carga a ser desplazada y los microtúbulos. Estas proteínas tienen un sitio de unión a la carga y en otro extremo un sitio de unión al microtúbulo. El sitio de unión al microtúbulo es la región motora, que normalmente consta de dos cabezas y realiza un desplazamiento unidireccional intercalando el movimiento de una cabeza con la otra, de una forma similar a la locomoción en los bípedos (Asbury, 2005).

En el caso de los movimientos del polo negativo al polo positivo del microtúbulo, o sea, con dirección anterógrada, la cinesina se ha identificado como proteína motora (Vale, *et al.*, 1985; Fig. 8A). La región motora está constituida por un dímero de la cadena pesada, mientras que la región de unión a la carga es un dímero de la cadena ligera. El desplazamiento motor de la cinesina (Fig. 8B; Asbury, 2005) y su posible activación han sido muy estudiadas. Como lo han demostrado experimentos con mutantes, la cadena ligera es necesaria para el marcaje y activación de la cinesina *in vivo*. Cuando se elimina la cadena ligera, la cadena pesada se aglutina alrededor del aparato de Golgi (Rahman, *et al.*, 1999).

La dinámica funcional de la cinesina involucra cambios conformacionales. Cuando la cinesina no está unida a su carga, la cola de la cadena ligera se une a la cadena pesada, provocando un plegamiento (Stock, *et al.*, 1999). La forma plegada de la cinesina tiene poca afinidad a los microtúbulos (Verhey, *et al.*, 1998) y baja actividad de ATPasa (Coy, *et al.*, 1999). Al parecer la cola de la cinesina actúa como un inhibidor del desplazamiento cuando no está unida a su carga (Friedman y Vale, 1999). Esto ahorra el gasto de ATP si no hay alguna carga a desplazar.



**Figura 8.** (A) Modelo estructural de la cinesina. Tomado de Asbury, 2005. (B) Posible mecanismo del desplazamiento de la cinesina sobre un filamento de tubulina. I. La cabeza que está fija al microtúbulo no tiene nucleótido y la cabeza libre está unida a ADP (adenosín difosfato). II. El ATP se une a la cabeza trasera, lo cual promueve que la cabeza delantera se ancle al microtúbulo. III. La cabeza delantera libera ADP y se fija al microtúbulo, creando tensión en las uniones del cuello. IV. El ATP se hidroliza en la cabeza trasera, ésta se libera del microtúbulo y por la tensión da un paso adelante. Modificado de Amos y Cross, 1997.

La activación de la cinesina parece darse por la unión de la cadena ligera a su carga (Coy, *et al.*, 1999), por la fosforilación de la cadena ligera (Matthies, *et al.*, 1993; Lindesmith, *et al.*, 1997) o de la cadena pesada (Doneland, *et al.*, 2002) y por un cambio en el pH de la carga (Verhey, 1998). La actividad del motor podría ser regulada por el cambio en la concentración de calcio, afectando a un sensor del ión en la cadena ligera, como ocurre con la calmodulina (Matthies, *et al.*, 1993).

Recientemente, se ha descubierto que otro sensor de calcio, la calsinténina, participa en el anclaje de las cargas vesiculares con la cinesina. La calsinténina es una proteína transmembranal de la familia de las cadherinas (Vogt, *et al.*, 2001), con segmentos de unión al sitio TPR de la cadena ligera de la cinesina. Algunas mutaciones en dichos

segmentos reducen la unión con la cadena ligera de la cinesina y además alteran el transporte de los organelos vesiculares unidos a calsyntenina (Konecna, *et al.*, 2006).

La unión de la cinesina a su carga de organelos se relaciona con una proteína membranal denominada cinectina (Kumar, *et al.*, 1995, Sheetz, 1996). También existen formas solubles de cinectina que podrían participar en la unión de la cinesina con cargas no membranales (Kumar, *et al.*, 1998; Sheetz, 1999). La cinectina membranal es esencial para la unión de la cinesina con las vesículas, ya que al usarse un anticuerpo para el epitopo nativo de la cinectina, dicha unión se inhibe (Kumar, *et al.*, 1995).

La región del cuello de la cinesina que une a las cadenas pesadas, participa en el desplazamiento del motor. Esta región está conformada por una secuencia de 15 residuos de aminoácidos y funciona como un amplificador mecánico del movimiento. Esto se sabe por que al mutar la región del cuello, la velocidad de desplazamiento de la cinesina se reduce dramáticamente (Case, *et al.*, 2000).

También, se ha propuesto que la cinesina es responsable del transporte anterógrado de vesículas a “largas distancias”, desde el aparato de Golgi hasta la periferia de la célula; mientras que otro motor asociado a la actina, como la miosina, transportaría las vesículas a distancias cortas para su posterior fusión con la membrana (Kamal y Goldstein, 2000).

La proteína dineína participa en el movimiento retrógrado basado en microtúbulos (Schnapp y Reese, 1989). La cadena pesada de la dineína es más grande que la de la cinesina y algunas de sus formas pueden tener tres cabezas (Goldstein y Yang, 2000). Se sabe también que su movimiento es regulado por calcio.

Otra proteína, la dinactina, participa en la regulación del transporte retrógrado en los microtúbulos. Probablemente la activación de la dineína está relacionada con su unión a la dinactina (Vallee y Sheetz, 1996). La dineína flagelar es regulada por calcio en alguno de

sus tres brazos. En el brazo interno hay dos sensores de calcio, la centrina y la calmodulina. El brazo externo posee al menos un sensor proteico de calcio conocido como LC4 que regula la sensibilidad al ATP en el brazo externo (Sakato y King, 2003).

Aunque se reconoce a la kinesina y a la dineína como motores con dirección anterógrada y retrógrada respectivamente, en algunos casos estas proteínas pueden tener la actividad contraria (Bloom, 1992).

La actividad de las proteínas motoras también puede ser regulada por la proteína tau. Ésta afecta la unión de los motores moleculares a los microtúbulos. En presencia de la proteína tau, la efectividad de unión de la kinesina al microtúbulo es menor que la de la dineína. Sin embargo, bajo las mismas condiciones la probabilidad de desunión al microtúbulo de ambas proteínas aumenta (Trinczek, *et al.*, 1999).

Algunas proteínas motoras, como la dinamina, participan en la endocitosis. Se propone que participan en el cierre de los poros de fusión formados entre las vesículas y la membrana celular, formando un cinturón que envuelve al cuello del poro y lo cierra. Esta actividad se considera primordial para que ocurra la endocitosis en vesículas secretoras. Así lo demuestran las moscas mutantes *shibire*, que al tener una mutación en el gen que codifica a la dinamina no pueden llevar a cabo el reciclaje de vesículas sinápticas (Kosaka, *et al.*, 1983; Ramaswami, *et al.*, 1994).

Se ha sugerido que la dinamina forma paquetes que “barren” regiones de secreción activas en la membrana. Al encontrar un sitio de exocitosis, estos paquetes inducen la endocitosis con un retardo de 30 segundos. La formación de paquetes depende de los microtúbulos, ya que al ser desensamblados, los paquetes se reducen en un 50% en

respuesta a una estimulación (Tsuboi, *et al.*, 2002). Sin embargo, la dinamina 2, se asocia estrechamente con los microfilamentos de actina (Schafer, 2004).

## **MOVILIZACIÓN VESICULAR.**

En los últimos años se ha avanzado enormemente en el conocimiento del transporte vesicular asociado a la liberación de neurotransmisores. Dicho auge puede explicarse por la utilización de técnicas novedosas, que si bien sus principios se habían propuesto desde tiempo atrás, su aplicación en el estudio de la secreción y las dinámicas vesiculares tuvo que esperar bastante tiempo para alcanzar el desarrollo tecnológico adecuado. Estas técnicas incluyen principalmente la amperometría, la medición de capacitancia, el uso de colorantes lipofílicos, y el desarrollo de nuevas técnicas ópticas, como la excitación de fluorescencia multifotónica y la microscopía de onda evanescente (TIRFM por su siglas en inglés Total Internal Reflexion Fluorescence Microscopy; para revisiones Angelson y Betz, 1997; Neher, 1998).

En células neuroendocrinas ha sido difícil establecer las dinámicas e incluso la existencia de pozas vesiculares. Sin embargo, con el uso de la microscopía de onda evanescente se han visto grandes pozas vesiculares atracando en zonas cercanas a la membrana plasmática y permanecer ahí hasta detectar una señal para su liberación (Steyer, *et al.*, 1997). Una vez anclados los gránulos de secreción tienen poco movimiento e intercambio por gránulos nuevos, de manera que la llegada de nuevas vesículas, sólo ocurre después de un proceso de exocitosis (Steyer y Almers, 1999).

La secreción de contenidos vesiculares se colocaliza con los microdominios de calcio (Llinás, *et al.*, 1992) formados ante el aumento en la concentración de calcio debido

a la entrada repentina del ión a través de los canales transmembranales. Así la alta concentración de calcio en un microdominio estimula la secreción a partir de la fusión de una vesícula cercana. Sin embargo, no todas las vesículas expuestas al microdominio de calcio son excitadas. La alta concentración local puede facilitar el acercamiento de las vesículas hacia la zona de influencia del microdominio y presumiblemente favorecer la exocitosis de la vesícula en respuesta a la siguiente estimulación (Becherer, *et al.*, 2000).

La liberación de calcio de las pozas intracelulares puede producir efectos similares a la entrada de calcio extracelular. Al liberarse el calcio interno, la concentración de calcio local produce zonas de alta concentración. Si se considera la concentración promedio de calcio intracelular, ésta no es suficiente para estimular la secreción de vesículas electrodensas. Así, se requiere de una concentración mayor a la promedio, que es alcanzada en las zonas cercanas a la liberación de las pozas de calcio (Tse, *et al.*, 1997).

## **EXOCITOSIS Y EL CITOESQUELETO**

Existen evidencias de la interacción entre la secreción vesicular y el citoesqueleto, principalmente con la corteza de actina y con los microtúbulos. La corteza de F-actina esta formada por una red de microfilamentos que envuelve al citoplasma en la zona inmediata a la membrana celular. Se ha supuesto que dicha corteza puede actuar como barrera para el desplazamiento de las vesículas secretoras. Sin embargo, su papel en la exocitosis parece ser mucho más complicado, dado que en células no excitables la despolimerización de la F-actina puede activar la secreción. Pero si en el mismo tipo celular se desensambla por completo la corteza de actina, la exocitosis se elimina, lo que indica que hay requerimientos

mínimos de corteza de actina para el buen funcionamiento de la secreción (Muallem, *et al.*, 1995).

En células PC-12, la movilidad de las vesículas en la corteza de actina depende de ATP. Si se usa un inhibidor de miosina, la movilidad subplasmática se reduce (Lang, *et al.*, 2000). Se ha propuesto que la corteza de actina es un bloqueador del movimiento vesicular, pero que las dinámicas de polimerización permiten el desplazamiento de las vesículas a través de ella. Al mismo tiempo, la corteza de actina facilita la movilización vesicular mediante una molécula motora similar a la miosina. Así, la corteza de actina mediaría también el transporte vesicular en zonas cercanas a la membrana, de acuerdo con lo observado en células cromafines (Lang, *et al.*, 2000). Sin embargo, en las mismas células la colchicina reduce la velocidad de desplazamiento de las vesículas secretoras, sugiriendo también la participación de los microtúbulos (Tsuboi, *et al.*, 2002).

La estabilización o la despolimerización de los microtúbulos afectan a la secreción lenta en células cromafines, sin modificar la etapa rápida. Por otro lado la inhibición de la actina y de la miosina afecta la etapa rápida de la secreción (Ñeco, *et al.*, 2003). Esto indica que los microtúbulos transportan complejos vesiculares de las pozas de reserva a las pozas de liberación, mediando un tráfico entre lugares internos hacia regiones periféricas de la célula. (Kamal y Goldstein, 2000).

Para estudiar la función de los microtúbulos en el transporte vesicular, también se han utilizado células transfectadas con proteínas de secreción marcadas con GFP. En estas células el desacople de los microtúbulos interrumpe la movilidad de vesículas en el citoplasma y retarda la secreción, sin eliminarla por completo. Después del período de estimulación, las células tratadas con nocodazol (compuesto que favorece la despolimerización de los microtúbulos) presentan una mayor cantidad de proteína secretora

que las células control. De manera que al afectarse a los microtúbulos no se logra la secreción característica de las células control (Wacker, *et al.*, 1997).

La secreción en mastocitos también es afectada por el uso de fármacos antimitóticos. En respuesta a un antígeno, la secreción se reduce a un cuarto de su valor en células tratadas con colchicina, mientras que la movilidad interna de las vesículas secretoras se interrumpe (Smith, *et al.*, 2003). Esto indica que en algunos tipos celulares, a diferencia de las células cromafines, los microtúbulos participan tanto en fases iniciales como finales de la secreción.

La disrupción de los microtúbulos, también afecta la distribución de proteínas asociadas al transporte vesicular, como el complejo Exocyst (Bowser, *et al.*, 1992). Este complejo regula la exocitosis, guiando a las vesículas secretoras hacia las zonas de liberación. En células PC-12 diferenciadas que comienzan a generar extensiones neuríticas, el complejo Exocyst se distribuye preferencialmente en los ápices neuríticos, donde también hay complejos de microtúbulos. Cuando se aplica nocodazol a células diferenciadas, el complejo Exocyst está disperso en el cuerpo celular, esta distribución es similar a la de los microtúbulos (Vega y Hsu, 2001).

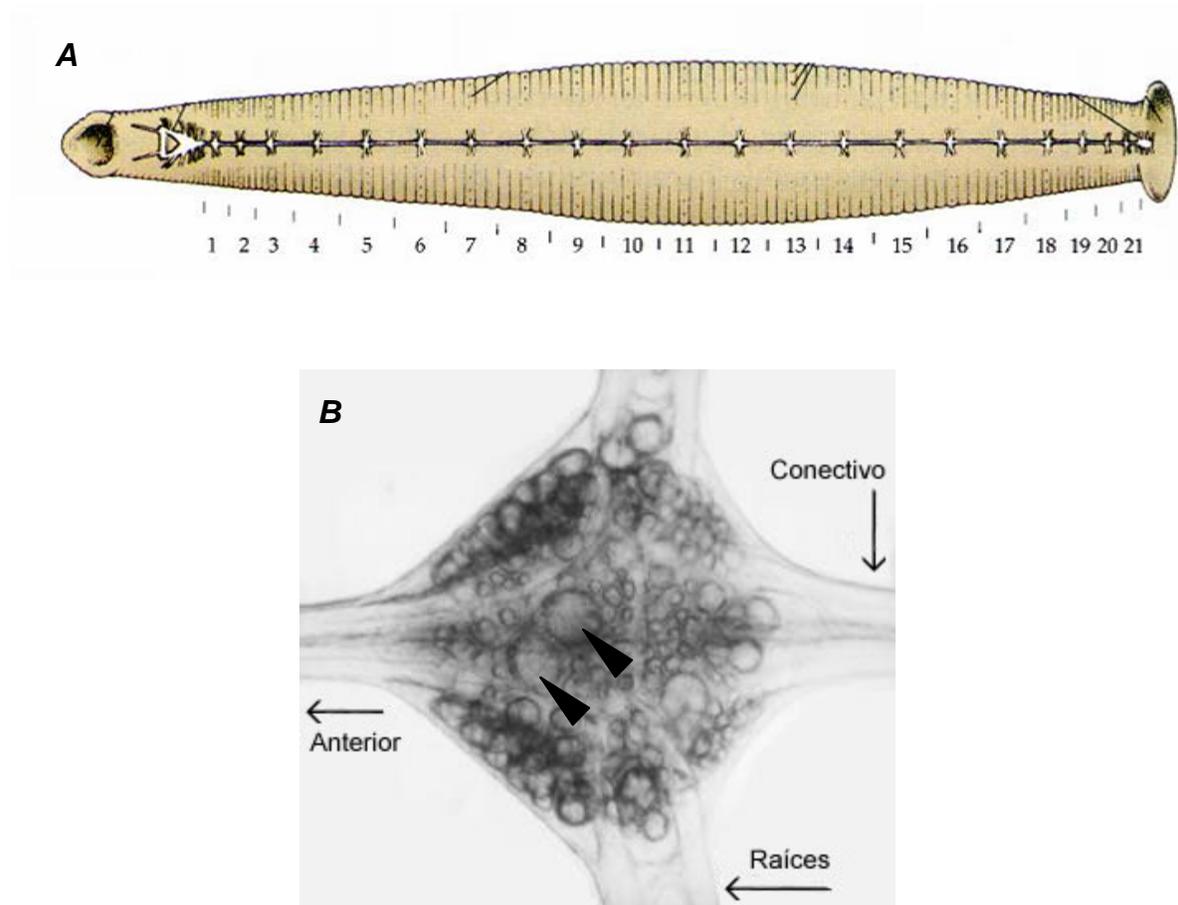
Con base en lo anterior y aunado a la evidencia acerca de la secreción somática en la neurona de Retzius, la movilización de los cúmulos vesiculares podría llevarse a cabo por medios activos. Como en otros tipos celulares, en particular en células neuroendocrinas, el mecanismo de movilización de los cúmulos en la secreción somática de serotonina sería mediado por el citoesqueleto.

## **SISTEMA NERVIOSO DE LA SANGUIJUELA.**

Para estudiar la secreción somática de serotonina y su relación con los microtúbulos, usamos la neurona de Retzius en cultivo de la sanguijuela europea *Hirudo medicinalis* (Linné, 1758). El sistema nervioso central de la sanguijuela (Fig. 9A) consta de 34 ganglios nerviosos conectados por un cordón nervioso ventral. Seis de los ganglios están en la región cefálica, aquí uno forma el cerebro supraesofágico conectado a otro subesofágico, mientras que los otros cuatro ganglios forman la masa ventral del cerebro. Otros siete ganglios están fusionados en una masa caudal. Los veintiún ganglios intermedios están conectados en serie a lo largo del cordón ventral y unidos entre sí por el nervio de Faivre y las fibras de Rohde. Cada ganglio del cordón ventral contiene alrededor de 400 neuronas (Fig. 9B) la mayoría de ellas pareadas, entre las cuales se conocen las funciones de aproximadamente dos tercios (considerando que están en pares; Kristan, *et al.*, 2005).

Dentro del ganglio las neuronas están dispuestas en seis paquetes ventrales, dos centrales, dos anteriores y dos posteriores. En la región dorsal está el neuropilo, donde se establecen las conexiones sinápticas. En el paquete central anterior hay un par de células de Retzius. Se caracterizan en el microscopio estereoscópico porque tienen los somas más grandes de cada ganglio. Cada par de neuronas de Retzius está acoplado eléctricamente entre sí (Hagiwara y Morita, 1962; Eckert, 1963; García-Pérez, *et al.*, 2004). Además en los otros paquetes laterales hay 14 neuronas mecanorreceptoras sensibles a estímulos de tacto (T), presión (P) o daño (N). Cada una de ellas tiene un cuerpo identificable por su tamaño y una localización típica. Las neuronas T, P y N están conectadas monosinápticamente a la motoneurona L (Leydig), que controla las contracciones musculares. Todas las neuronas mecanosensoriales forman conexiones polisinápticas con las células de Retzius (Wittenberg, *et al.* 1990; Velásquez-Ulloa, *et al.*, 2003).

El cordón ventral de las sanguijuelas no posee axones gigantes (fibras gigantes) como los demás anélidos, sin embargo existen fibras (fibras de Rohde de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro) y manojos de fibras (nervio de Faivre) que están segmentados y conectados entre un ganglio y otro, estos forman un sistema que conduce con una velocidad aproximada de 1m/s (Mann, 1961).



**Figura 9.** Sistema nervioso de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*. (A) Esquema del sistema nervioso compuesto por una cadena con 21 ganglios similares, y dos masas nerviosas formados por la fusión de varios ganglios, una anterior y otra posterior. (B) Micrografía de un ganglio nervioso, cada ganglio presenta alrededor de 400 neuronas, la mayoría en pares. Las neuronas de Retzius (cabezas de flecha) son las neuronas más grandes de cada ganglio y contienen más de la mitad de la serotonina presente en el animal. Adaptado de Nicholls, *et al.*, 2001.

En la sanguijuela, la serotonina participa en casi todas sus conductas (Kristan, *et al.*, 2005), incluidas la locomoción, contracción, alimentación, y mecanismos defensivos (Kristan y Nusbaum, 1983). El gran tamaño del soma de la neurona de Retzius le permite liberar serotonina en cantidades mil veces mayores a las liberadas por la sinápsis (De-Miguel y Trueta, en preparación) cuando dispara potenciales de acción a alta frecuencia (Trueta, *et al.*, 2003). Por otra parte, al recibir estímulos nociceptivos, las neuronas P y N inducen disparos de alta frecuencia en la neurona de Retzius, que serían suficientes para provocar la secreción somática de serotonina. Así, la información sensorial podría inducir la secreción somática de las neuronas de Retzius y modular las conductas antes mencionadas (De-Miguel y Trueta, 2005).

Cuando se aplica un pinchazo en la piel de la sanguijuela, las neuronas P y Retzius disparan ráfagas de impulsos a alta frecuencia (Wittenberg *et al.* 1990), mientras que las neuronas N disparan ocasionalmente (Velázquez-Ulloa, *et al.*, 2003). También, la estimulación eléctrica de una neurona P puede activar a las neuronas de Retzius en todos los ganglios del cordón nervioso central (Szczupak y Kristan, 1995). Por otra parte, un toque ligero en la piel produce una ráfaga de disparos en la neurona T y si el estímulo se intensifica, la actividad eléctrica en dicha neurona se adapta. Al disminuir la actividad en la neurona T con un estímulo intenso, la actividad en la neurona de Retzius se incrementa (Velázquez-Ulloa, *et al.*, 2003). Así, la neurona T podría contribuir al inicio y final de una reacción en respuesta a estímulos de diferentes intensidades, favoreciendo principalmente a la liberación sináptica. En contraste, la neurona P propiciaría un incremento en la actividad de la neurona de Retzius suficiente para evocar la secreción somática, mientras que la neurona N la reforzaría.

## **HIPÓTESIS**

- Si la movilización vesicular en la secreción somática de serotonina depende de los microtúbulos, entonces el uso de un fármaco que favorezca la despolimerización de los microtúbulos reduciría la exocitosis.
- Si las vesículas cercanas a la membrana pueden desplazarse por medios distintos a los microtúbulos, entonces la secreción inmediata a la estimulación inicial podría no afectarse por la colchicina.
- Si la endocitosis es dependiente de los microtúbulos, entonces el tratamiento con colchicina afectaría este proceso.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general.**

- Estudiar la participación de los microtúbulos en la movilización vesicular durante la secreción somática de serotonina.

### **Objetivos particulares.**

- Medir la secreción somática de serotonina en las neuronas de Retzius en tiempo real por medios ópticos.
- Comparar las cinéticas de la secreción somática de serotonina a lo largo del tiempo en células estimuladas bajo diferentes condiciones.
- Analizar como afecta la despolimerización de los microtúbulos a la secreción somática de serotonina.
- Comparar la función del citoesqueleto en la exocitosis y la endocitosis.

## METODOLOGÍA Y MATERIALES

### PREPARACIÓN BIOLÓGICA

#### Disección

Los experimentos se hicieron en neuronas de Retzius en cultivo. Las neuronas fueron aisladas de acuerdo con el protocolo de Dietzel *et al.*, 1986. Para ello se extrajeron los ganglios del sistema nervioso de la sanguijuela, colocándola en un plato de 15 cm de diámetro, con fondo de Sylgard (Dow Corning, MI, EUA), donde fue inmovilizada estirándola longitudinalmente mediante el uso de alfileres. Para mantener al animal en buenas condiciones se le agregó constantemente solución Ringer normal. El sistema nervioso de la sanguijuela fue expuesto haciendo un corte longitudinal por la parte ventral del animal con ayuda de un bisturí. Se cortaron las raíces para separar los ganglios del cuerpo del animal. Los ganglios 5 y 6 fueron desechados ya que son diferentes a los demás debido a que regulan funciones sexuales.

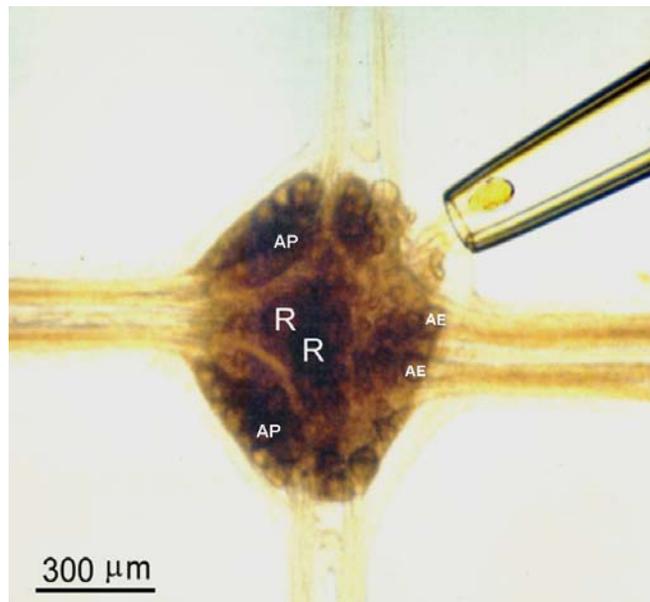
Las cadenas de ganglios se trasladaron a un plato de cultivo de 30 mm de diámetro con fondo de Sylgard con 3 ml de medio de cultivo: L-15 Leibovitz, glucosa 6 mg/ml (Sigma, Steinheim, Alemania), gentamicina 0.1mg/ml (Rayere, México) y suero bovino fetal inactivado al 2%, pH 7.4. Las cadenas fueron estiradas con microalfileres, mostrando la cara ventral hacia arriba. Los ganglios fueron descapsulados rompiendo el tejido que los envuelve con el uso de dos pinzas finas.

Dado que las neuronas están envueltas en la matriz extracelular y ésta dificulta el aislamiento y cultivo, los ganglios se trataron con colagenasa dispasa (Roche, Mannheim, Alemania) a una concentración de 2mg/ml en el plato. El plato se mantuvo en agitación

durante una hora, después de la cual se lavó dos veces con medio de cultivo estéril, dentro de una campana de extracción.

### **Cultivo de neuronas**

El par de células de Retzius fue extraído por succión de cada ganglio (Fig. 10). Las neuronas se cultivaron de dos en dos en platos de cultivo de 30 mm con fondo de vidrio y con 3ml de medio de cultivo sin suero, asegurándose de que el soma y el muñón de las células se adhirieran al vidrio. Después de un día se le agregó suero bovino fetal.



**Figura 10.** Aislamiento de neuronas del ganglio nervioso de la sanguijuela. Se muestra como se succiona una neurona P del ganglio con el uso de una micropipeta. Tomado de Dietzel, *et al.*, 1986.

## **Tratamiento farmacológico**

Para desensamblar los microtúbulos se agregó colchicina (Calbiochem, Darmstadt, Alemania; 10 ó 100  $\mu\text{M}$ ) al medio de cultivo en cajas con células sanas una hora antes de los registros.

## **ESTUDIO DE LA SECRECIÓN SOMÁTICA DE SEROTONINA.**

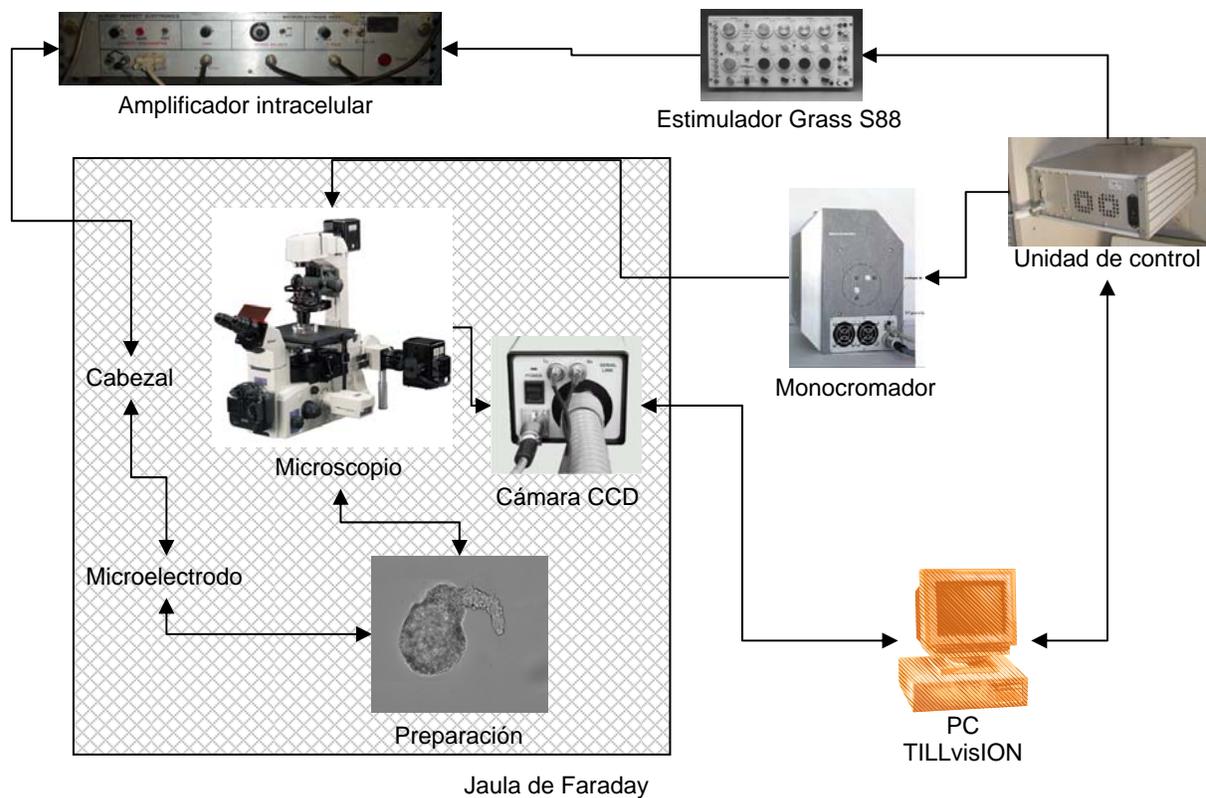
### **Tinción con FM1-43**

El colorante FM1-43 es un compuesto lipofílico que en medio acuoso no emite fluorescencia, pero al entrar en contacto con una membrana celular fluoresce a 540 nm en respuesta a luz de una longitud de onda de 480 nm.

Cuando el colorante entra en contacto con la membrana celular se produce una fluorescencia inespecífica que revela la superficie membranal. Durante la exocitosis, las vesículas secretoras se fusionan con la membrana celular, lo cual aumenta la superficie de membrana y por lo tanto la fluorescencia mientras el colorante se encuentra en el medio extracelular (Smith y Betz, 1996). Cuando las vesículas se cierran y regresan al interior de la célula, llevan consigo al colorante, lo que permite visualizarlas. De este modo, después de lavar el colorante que se encuentra en la superficie de la célula, aún se podrá observar fluorescencia dentro de la célula debido a la endocitosis. En las células de Retzius la fluorescencia posterior al lavado presenta un patrón de puntos, donde cada punto corresponde a un cúmulo vesicular endocitado (Trueta *et al.*, 2003). Entonces este bioensayo permite tener una medida para la exocitosis, que es el aumento en fluorescencia y otra medida para la endocitosis, que es el colorante internado a la célula.

Para teñir a las células con el colorante FM1-43, se aplicó un protocolo modificado (Betz, 1992) que se describe a continuación. A la caja con la célula se agregó FM1-43

(Molecular Probes, OR, EUA), a una concentración final de 2  $\mu$ M (Trueta, et. al., 2003). Las neuronas se incubaron en oscuridad de 10 a 15 minutos. Las neuronas fueron observadas con un microscopio invertido Eclipse TE-200 (Nikon, Tokio, Japón), mientras que la fluorescencia fue visualizada mediante el sistema T.I.L.L. Photonics (GmbH, Alemania) con la aplicación de un haz luz de 488 nm (Diagrama 1). Para la emisión se usó un filtro Nikon de 488-535 nm montado en el microscopio.



**Diagrama 1.** Equipo usado para el registro óptico.

Para inducir la secreción somática de serotonina se aplicaron dos tipos de estímulos en presencia del FM1-43 en el medio extracelular. En cuatro células se produjo la liberación de las reservas internas de calcio con cafeína (10 mM; Sigma; Trueta, *et al*,

2004). Otras células fueron estimuladas eléctricamente con trenes de diez impulsos a 20Hz, frecuencia que es óptima para inducir la secreción somática de serotonina (Trueta, *et al* 2003). La estimulación eléctrica se realizó tanto en células control como tratadas con colchicina.

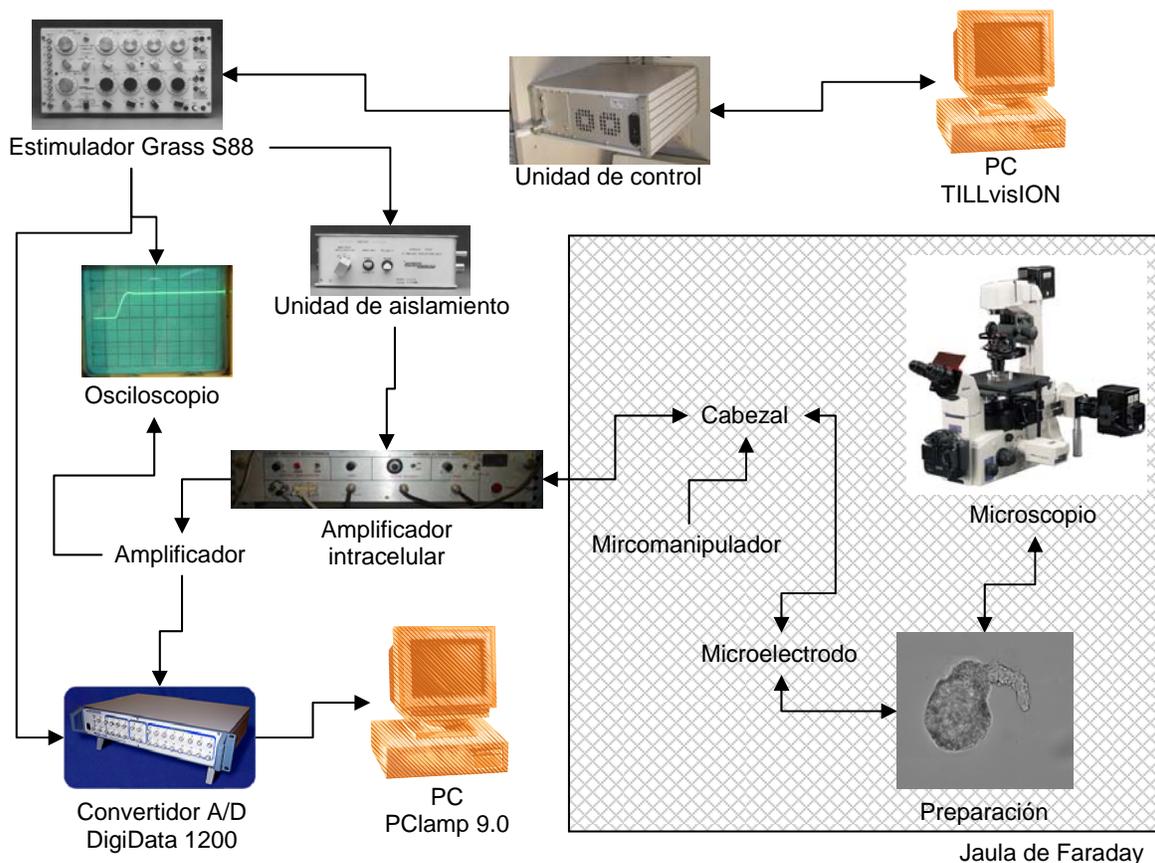
Cuando el protocolo de estimulación eléctrica se había completado, el medio de cultivo fue sustituido por solución Ringer adicionado con glucosa y N-metil-D-glucamina (Sigma) para igualar la osmolaridad del medio a la intracelular de 330 mosm/l. Se dejó fluir la solución durante 10 minutos, para retirar el colorante unido a la superficie membranal y poder cuantificar los sitios de endocitosis como puntos fluorescentes, que en estas neuronas corresponden a los cúmulos multivesiculares (Trueta, *et al.*, 2003).

### **Estimulación intracelular**

Para la estimulación eléctrica se usaron microelectrodos con una resistencia de 11-20 M $\Omega$ . La solución interna usada fue KCl a 3M. Los microelectrodos fueron hechos en un estirador de pipetas (P-97, Sutter, CA, EUA), a partir de microcapilares (1mm x 0.75mm, FHC, ME, EUA). Para posicionar el electrodo en la célula se usó un micromanipulador Leitz (Alemania).

Los cúmulos de vesículas electrodensas se distribuyen en estratos a diferentes distancias de la membrana como lo indican las evidencias de microscopía electrónica (De-Miguel, datos no publicados). Por ello tratamos a los cúmulos vesiculares como pozas liberables y de reserva. Así que usamos una estimulación repetida para facilitar la movilización y secreción de los diferentes estratos vesiculares. Se aplicaron trenes de 10 pulsos a 20 Hz a intervalos de 2 minutos. Los registros intracelulares fueron realizados con un preamplificador intracelular Pre 1B (Almost Perfect Electronics, Basel, Suiza). Los

trenes de impulsos se produjeron usando un estimulador S88 con unidad de aislamiento SIU5 (Grass, MA, EUA), controlado por el software TILLvisION v 4.01 (Impuls, GmbH, Alemania) mediante la unidad de control del sistema T.I.L.L. Photonics. El potencial de membrana de las células se monitoreó con un osciloscopio (Tektronix 2221A, OR, EUA). Mediante el uso de un digitalizador de señales DigiData 1200 y el software PClamp 9.0 (Axon Instruments, CA, EUA) se almacenaron los registros en una PC y posteriormente se analizaron con el mismo software (Diagrama 2).



**Diagrama 2.** Configuración del equipo para registro electrofisiológico.

## **Captura de imágenes**

Las imágenes en luz visible y con fluorescencia fueron capturadas mediante una cámara digital enfriada CCD (Charge Couple Device) IMAGO de T.I.L.L. Photonics y fueron almacenadas en una PC con el software TILLvisION (Diagrama 1). Se grabaron secuencias de imágenes de fluorescencia con un tiempo de adquisición de 400 ms a una frecuencia de 0.5 Hz, antes y durante la estimulación. Después del lavado de las células se tomó otra secuencia con una captura cada 2 segundos, a diferentes planos focales para visualizar los puntos fluorescentes en toda la neurona.

## **ANÁLISIS DE DATOS**

### **Análisis de los cambios en fluorescencia**

Para cada célula se eligieron áreas de píxeles que contuvieran un área de membrana determinada, y se hizo un promedio de los valores de luminosidad a lo largo del tiempo. De esta forma los cambios en la intensidad de la fluorescencia pudieron ser visualizados indirectamente de las gráficas. Se realizaron gráficas en tiempo real de la luminosidad de pequeñas áreas de membrana. Gracias a este análisis en línea pudimos observar objetivamente los cambios en fluorescencia en respuesta a la estimulación eléctrica.

Para el análisis estadístico de los cambios en la intensidad de fluorescencia, se incluyó a todo el soma de las células de Retzius.

Dado que las gráficas obtenidas a partir de los valores de intensidad de fluorescencia en la célula teñida estaban en unidades arbitrarias (de 0 a 4095) se normalizaron los datos para poder comparar las gráficas de fluorescencia. El valor de intensidad de la fluorescencia membranal antes de la estimulación fue tomado como el valor basal de 100%. Los datos individuales de las células fueron promediadas.

### **Conteo de puntos fluorescentes**

Las secuencias de imágenes en el eje  $z$  obtenidas después del lavado de las células, fueron usadas para contar los puntos fluorescentes totales en el soma de las células estimuladas eléctricamente. Estos puntos se consideran cúmulos vesiculares endocitados y tienen un diámetro promedio de  $1.2 \mu\text{m}$  (Trueta, et. al., 2003)

### **Análisis estadístico**

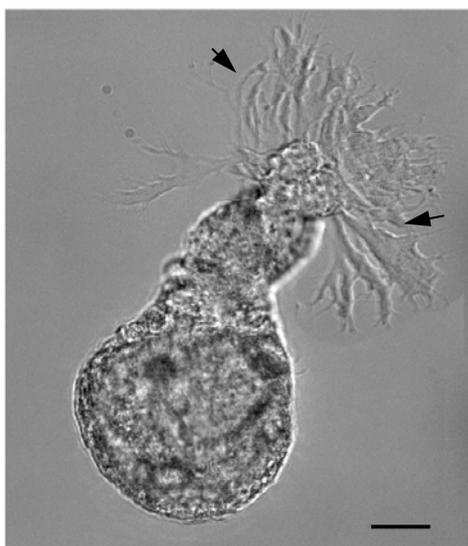
Para comparar los cambios en la intensidad de fluorescencia durante la estimulación eléctrica, usamos la prueba de suma de rangos de Wilcoxon de una sola cola. Esta prueba no paramétrica analiza pares de datos que en nuestro caso fueron los promedios de las gráficas individuales, un promedio para células control y otro para células tratadas con colchicina. Para comparar los porcentajes de fluorescencia finales se usó la prueba no paramétrica Mann-Whitney de una sola cola.

También se compararon los promedios de los puntos de fluorescencia por célula entre controles y células tratadas con colchicina. Para ello se realizó una prueba  $t$  de Student no pareada de una sola cola. Estas pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism v 4.0 (GraphPad Software, CA, E.U.A.). Los datos son presentados como la media  $\pm$  su error estándar.

## RESULTADOS

### Cultivo de neuronas de Retzius.

Para estudiar la secreción somática de serotonina se usaron neuronas de Retzius en cultivo. En estas condiciones la secreción medida con el uso del colorante FM1-43 es similar a la de neuronas en el ganglio (Trueta *et al.*, 2003). Las neuronas de Retzius sembradas en platos de cultivo sobre fondo de vidrio, desarrollaron extensiones neuríticas (Fig.11). Un buen estado fisiológico de las células, comprobado visualmente, mostró una superficie membranal rugosa y una transparencia característica al microscopio estereoscópico. Mediante registros eléctricos se garantizó que el potencial de reposo de las células fuera al menos de -50 mV, característico de células saludables, y similar al de las neuronas en el ganglio. También se verificaron la forma y duración de los potenciales de acción (Fig. 13 A, 16 A y B). Las células con potenciales de reposo menores a -50 mV o potenciales de acción anormales fueron excluidas de los experimentos. Algunas neuronas presentaban un registro de fluorescencia inestable, por lo que también fueron excluidas del estudio.



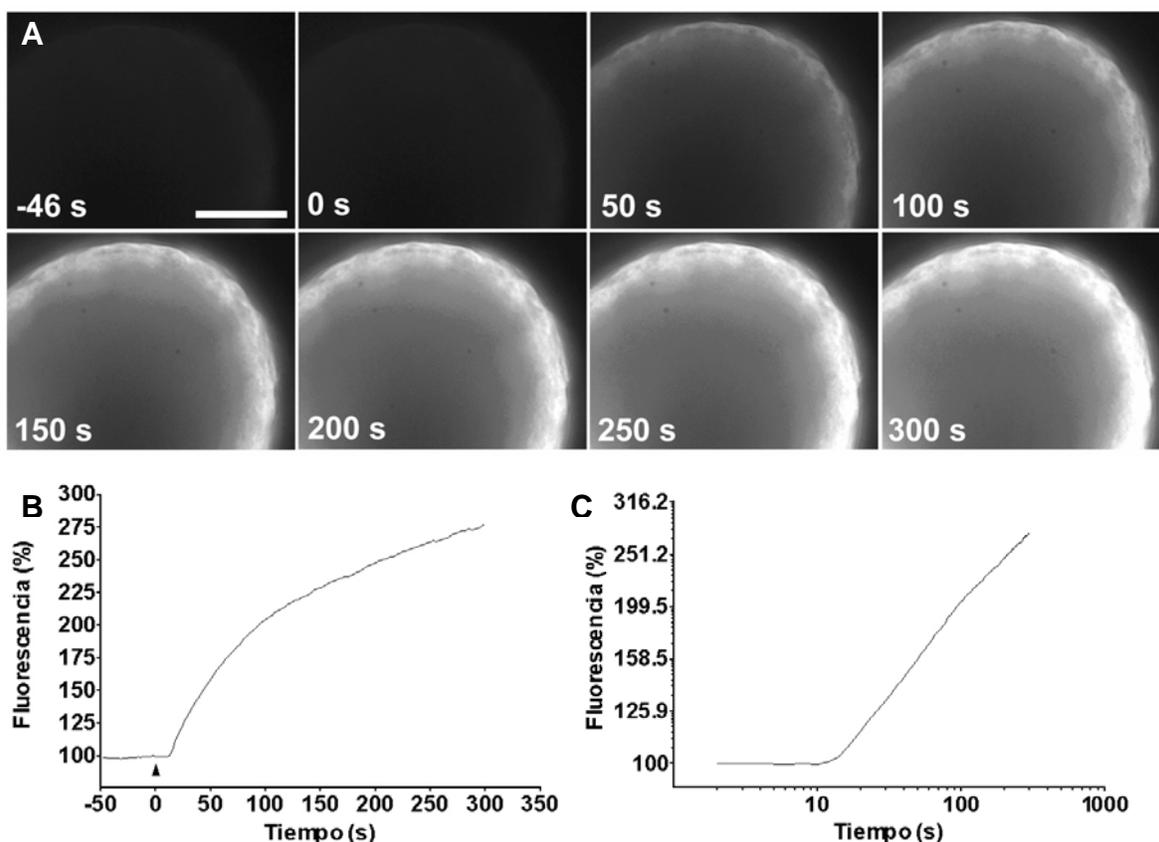
**Figura 11.** Micrografía de una neurona de Retzius en cultivo sobre un plato con fondo de vidrio, tomada con un objetivo 40x. Nótese las extensiones neuríticas (flechas). La barra mide 20  $\mu\text{m}$ .

### **Inducción de la secreción somática con cafeína.**

En algunas células (n=4) la secreción somática de serotonina se indujo con la aplicación de cafeína al medio extracelular, para activar la liberación de calcio de las reservas intracelulares (Fig. 12A; Trueta, *et al.*, 2004). Esto fue con la finalidad de tener un control positivo de la secreción somática en neuronas con altas concentraciones de calcio intracelular y comparar las cinéticas del aumento en fluorescencia. El cambio en fluorescencia a lo largo del tiempo durante la aplicación de la cafeína muestra un rápido incremento (Fig. 12B). La figura 12 muestra la fluorescencia en función del tiempo con una escala lineal (12B) y con escala logarítmica (12C). La recta en la escala logarítmica refleja un proceso en el que influyen factores independientes entre sí, que sugiere que la concentración interna de calcio es máxima e independiente de la entrada de calcio extracelular.

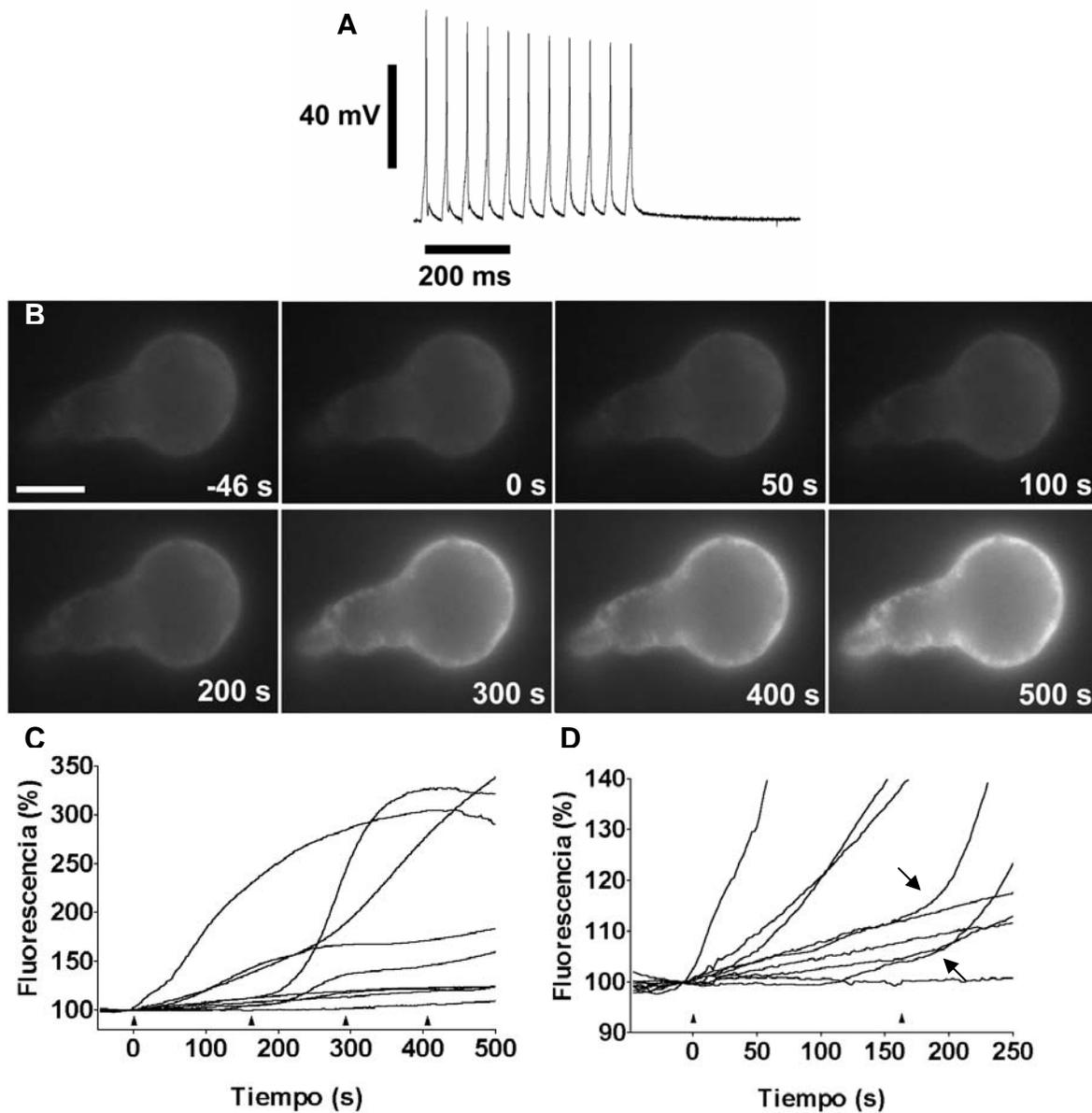
### **Inducción de la secreción somática de serotonina por estimulación eléctrica.**

La secreción también se indujo usando un protocolo de estimulación eléctrica consistente en trenes de 10 pulsos a 20 Hz (Fig. 13A) con un intervalo de 2 minutos entre ellos, usando un microelectrodo intracelular. Este protocolo provocó un incremento en la fluorescencia de la membrana celular en presencia del colorante FM1-43 (Fig. 13B). En la mayoría de los casos, la entrada del electrodo a la célula provocó una ráfaga de potenciales de acción a alta frecuencia seguido de un incremento en la fluorescencia, por lo que este momento se consideró como el inicio de la estimulación (Fig. 13C).



**Figura 12.** Incremento en fluorescencia en el soma en respuesta a la aplicación de cafeína 10 mM al baño. (A) Serie de imágenes de microscopía de fluorescencia de una neurona de Retzius estimulada con cafeína al tiempo cero, adquiridas con un objetivo 100x. La barra blanca mide 20  $\mu\text{m}$ . (B) Incremento en la fluorescencia del soma de una célula con respecto al tiempo, en respuesta a un pulso de cafeína. El triángulo señala el momento en el que se aplicó la cafeína. (C) Incremento en la fluorescencia de la misma célula que en B con escala logarítmica. La fluorescencia está dada con respecto al valor basal que se considera el 100%.

Las gráficas de células individuales de porcentaje de fluorescencia contra tiempo mostraron cinéticas y porcentajes distintos ( $n=9$ ; Fig. 13C). En algunas células se observan cambios drásticos en la pendiente de la cinética de fluorescencia en respuesta a la aplicación de estímulos (Fig. 13D). 500 segundos después de iniciarse la estimulación, los valores de fluorescencia en nueve células variaron de 110% hasta un 339%, con un coeficiente de variación de 46.54%.



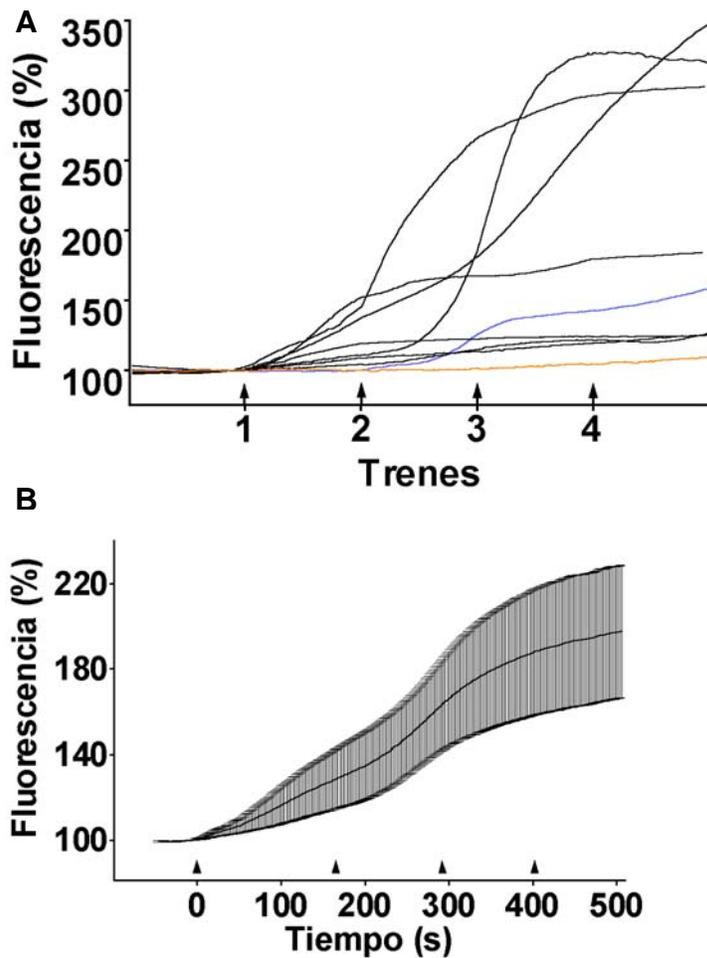
**Figura 13.** La aplicación del protocolo de estimulación induce un incremento en la fluorescencia en el soma celular. (A) Tren de 10 potenciales de acción a 20 Hz evocado con pulsos cuadrados de corriente. (B) Secuencia de imágenes de microscopía de fluorescencia de una neurona de Retzius estimulada eléctricamente en presencia del colorante FM1-43. Objetivo 40x, la barra mide 40  $\mu$ m. Cinéticas de cambio en la fluorescencia en nueve células control (C) y a escala aumentada (D). Las cabezas de flecha indican el momento de la aplicación de un tren de impulsos. El tiempo cero indica la entrada del electrodo intracelular, lo que provocó una ráfaga de impulsos a alta frecuencia marcado como el primer triángulo. Las flechas indican gráficas de fluorescencia con cambios en la pendiente. Nótese las diferentes latencias en el incremento de la fluorescencia y su relación con el momento de la aplicación de los trenes.

La fluorescencia promedio de estas células aumentó con un intervalo dinámico no lineal en los primeros 500 segundos después de la primera estimulación (Fig. 14B). Después de este tiempo la fluorescencia alcanzó una media de  $197.7 \pm 31.1$  (n=9). El cambio en la fluorescencia promedio fue escalonado y parece indicar un proceso compuesto por etapas (Fig. 14B). Después del cuarto tren de estimulación la fluorescencia promedio alcanzó una meseta, posteriormente a esta no se observó más incremento en la fluorescencia.

### **Secreción somática retardada.**

Las nueve células mostraron un aumento en la fluorescencia en presencia del colorante en respuesta a la estimulación eléctrica. Sin embargo, las pendientes iniciales fueron distintas y en ocasiones la respuesta óptica se inició después de varios trenes. Además, las pendientes de algunos registros se incrementaron después de varios trenes, mientras que otros llegaron a mesetas.

En siete de las nueve células la fluorescencia empezó a aumentar a partir de la primera ráfaga de impulsos (Fig. 14A). El segundo tren aplicado provocó el inicio del incremento en fluorescencia en una célula y en otra ocurrió después del tercer tren. Esto nos indica que aunque el mayor porcentaje de las células responde al primer estímulo, algunas pueden responder a estímulos posteriores. Pero el protocolo de estimulación usado, asegura la secreción en todas las células control.



**Figura 14.** (A) La secreción somática de serotonina se inicia en respuesta a un número distinto de estímulos eléctricos. En la mayoría de las células control el aumento en fluorescencia inició en respuesta al primer tren de pulsos (negro), mientras que en una célula aumentó en después del segundo (azul) y en otra después del tercero (rojo). (B) Promedio y error estándar del valor en fluorescencia de las nueve células control.

Lo anterior podría depender de la posición de los cúmulos vesiculares con respecto a la membrana plasmática, ya que como se mencionó anteriormente, en reposo las poblaciones se distribuyen a diferentes distancias de la membrana. En algunas células el incremento inicial de fluorescencia fue rápido (Trueta, *et al.*, 2003), lo que podría deberse a la secreción desde cúmulos adyacentes a la membrana. En otras neuronas el inicio en el incremento de la fluorescencia fue lento. Después se observan fases de incremento rápido con latencias variables respecto al inicio de la estimulación. Estas fases corresponderían a la secreción a partir de los cúmulos de vesículas originalmente dispuestos a distancias

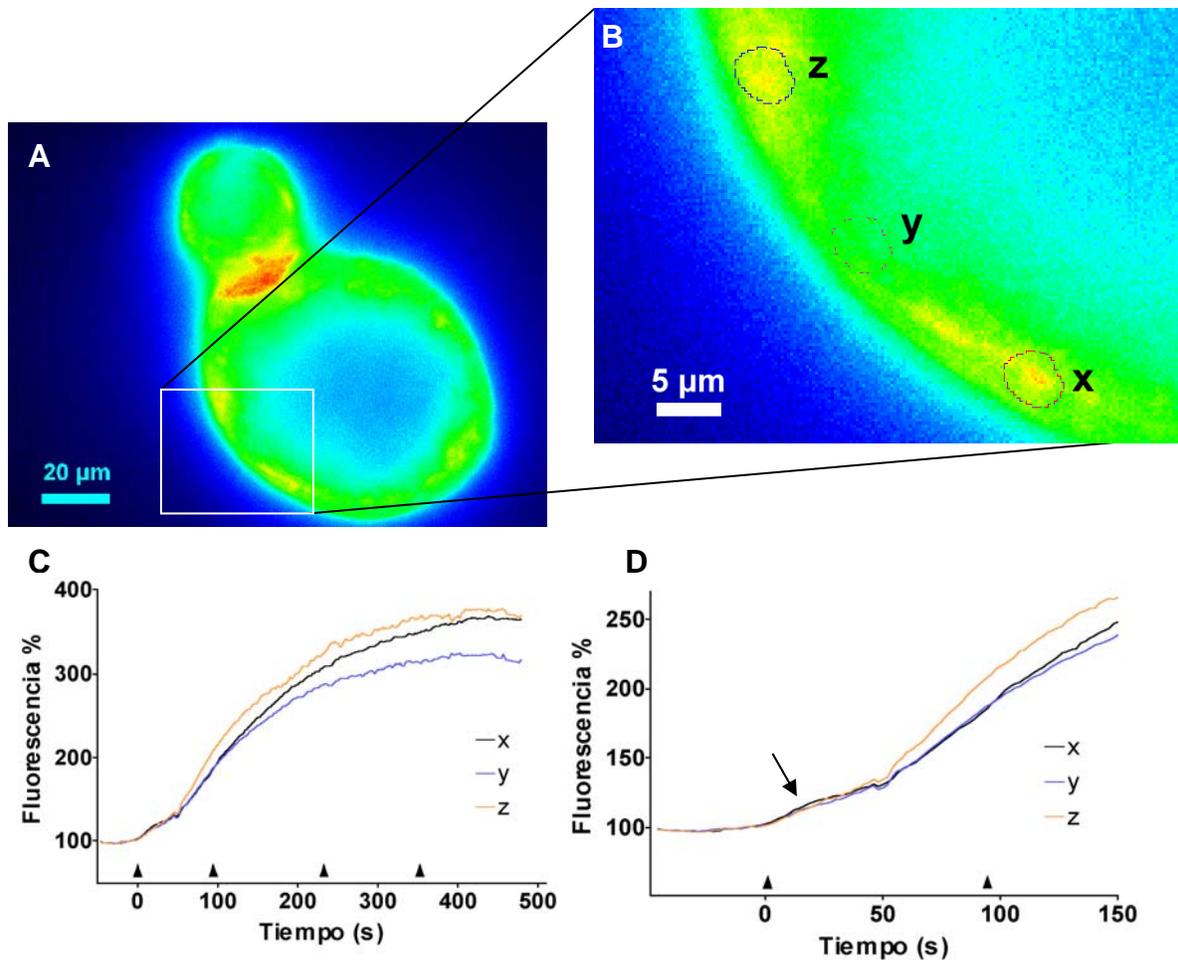
intermedias, cuya movilización se inició con la estimulación previa, y que comienzan a llegar a la membrana plasmática después de varias estimulaciones.

De acuerdo con esto, es posible que aquellas células que no secretaron ante los primeros estímulos, tuvieran en reposo cúmulos vesiculares distantes de la membrana y por lo tanto se necesitaran más estímulos para hacerlos llegar a ella. En siete de las nueve neuronas estudiadas, la fluorescencia alcanzó la saturación, sugiriendo el agotamiento de la poza vesicular. Las diferencias entre neuronas podrían entonces depender de la distribución de los cúmulos vesiculares en la célula.

### **Distribución membranal de la fluorescencia.**

Las neuronas de Retzius estimuladas en presencia del colorante FM1-43 tienen una distribución característica de su fluorescencia, con zonas más intensas que otras (Fig. 15A). Esto podría ser un indicador de que en esas zonas hay una mayor liberación de vesículas electrodensas. Por ello nos preguntamos si distintas regiones en una misma célula tendrían cinéticas de fluorescencia con características diferentes, mostrando distintas propiedades de secreción o endocitosis. Para ello estudiamos pequeñas regiones de las neuronas (Fig. 15B) y comparamos sus perfiles de intensidad de fluorescencia provenientes de imágenes capturadas cada 2 segundos, antes y durante la estimulación (Fig. 15C).

Las neuronas incubadas con FM1-43 en reposo tienen niveles de fluorescencia similares en toda la membrana y no se observan zonas más intensas que otras. Después de iniciar la estimulación, comienzan a aparecer zonas con más fluorescencia que otras. En general los cambios de fluorescencia en estas áreas pequeñas están ligados al incremento de fluorescencia en toda la célula, es decir su forma es parecida al promedio de toda la célula.



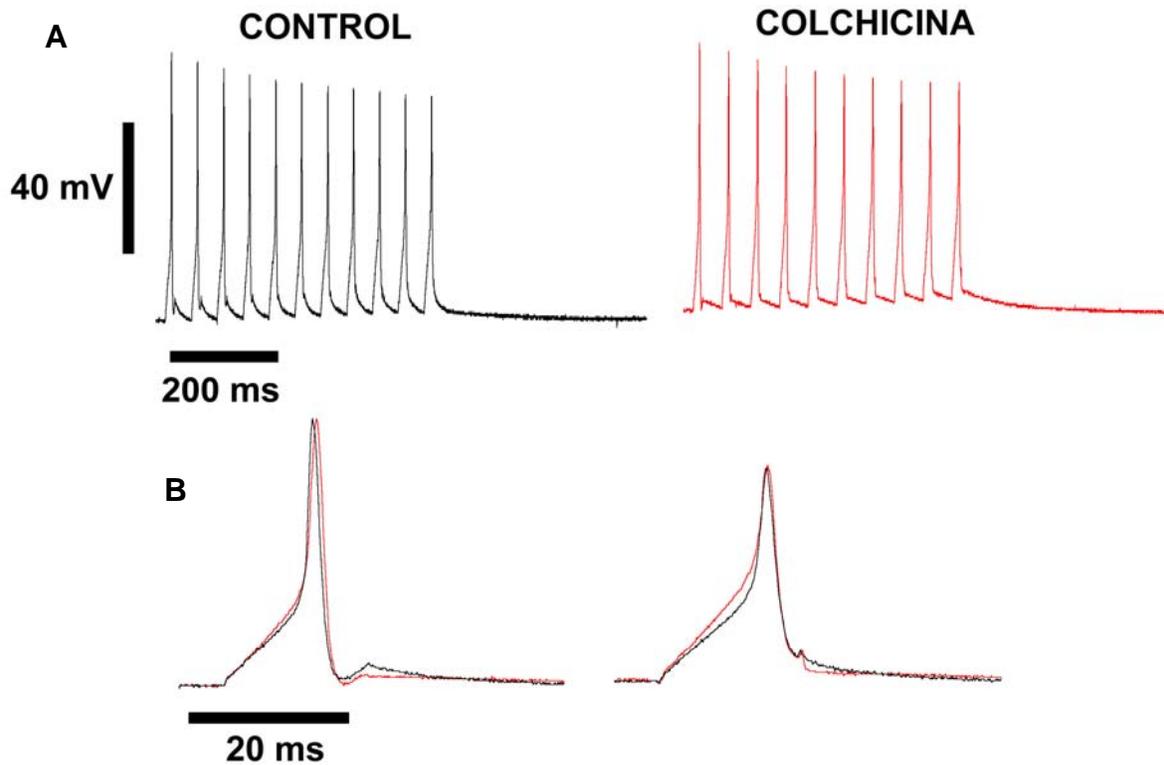
**Figura 15.** Los cambios en la fluorescencia son diferentes en áreas independientes de las células de Retzius. (A) Vista global con pseudocoloración de una neurona de Retzius estimulada en presencia de FM1-43. (B) Región aumentada con las áreas seleccionadas de la célula que presentan diferencias en la fluorescencia. (C) Gráfica temporal de la fluorescencia de las áreas marcadas en B y a escala aumentada (D). Las cabezas de flecha indican un tren de impulsos eléctricos. La flecha indica una joroba, que podría corresponder con la fusión sincronizada de las vesículas adyacentes a la membrana.

En distintas áreas de una misma célula el incremento inicial es muy similar (Fig. 15D), sin embargo conforme se aplican más trenes, algunas regiones muestran un mayor incremento en la fluorescencia. Las figuras 15 C y D muestran que la región con menor fluorescencia (la región “y”) tiene un incremento menor, mientras que la región “z” tiene

un incremento pronunciado después del primer tren de pulsos y la región “x” muestra un incremento mayor después del segundo tren. Al finalizar el registro óptico, las regiones “z” y “x” alcanzan un nivel de fluorescencia similar. En la mayoría de las células hubo variaciones de este tipo en la fluorescencia regional. Esto sugiere que hay zonas preferenciales para la secreción de serotonina.

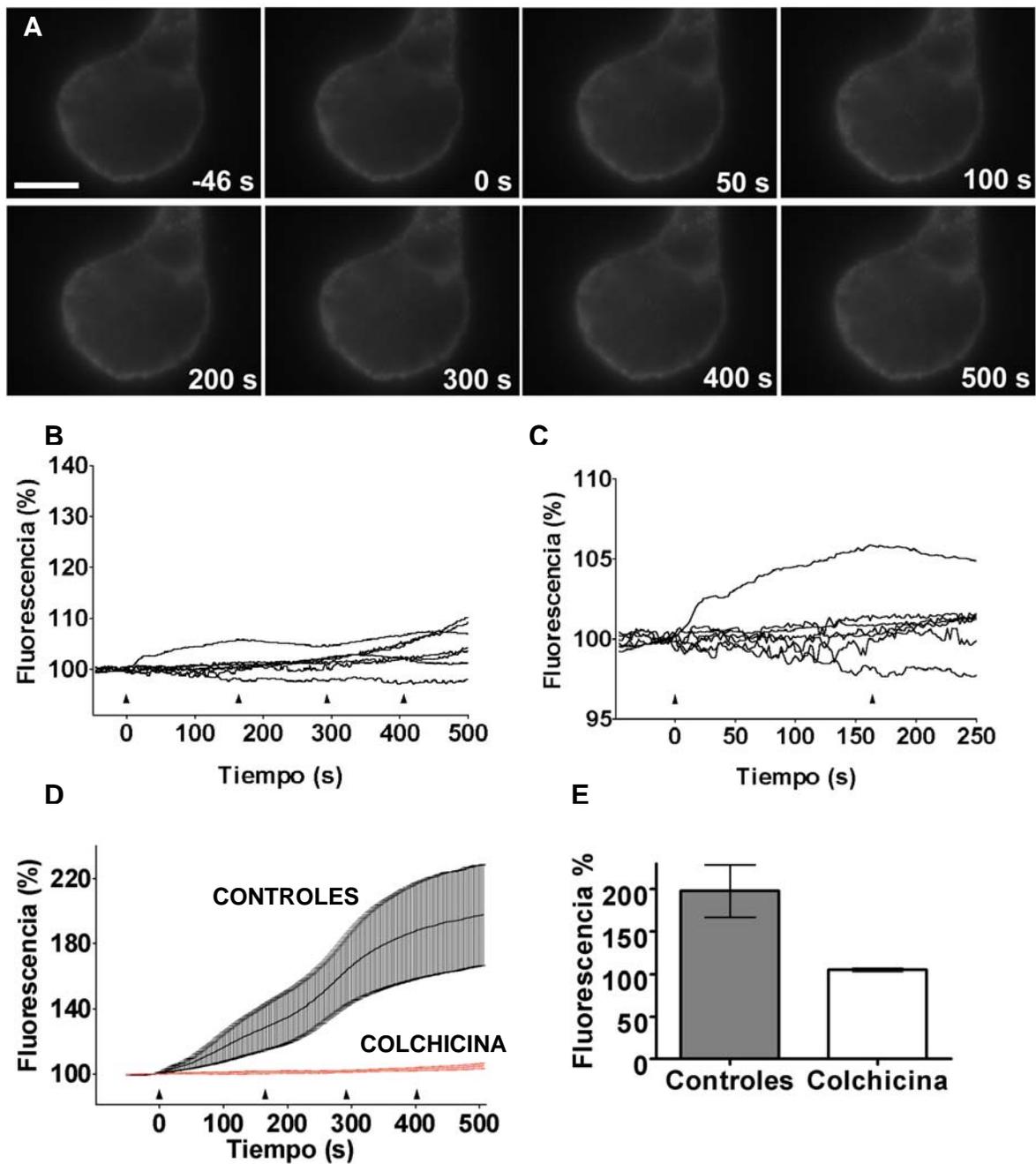
### **El tratamiento con colchicina reduce la secreción somática de serotonina.**

Para estudiar la participación de los microtúbulos en la secreción vesicular, se incubaron células de Retzius con el fármaco colchicina que inhibe la polimerización de la tubulina. Las neuronas se estimularon con el mismo protocolo de trenes de impulsos eléctricos. Los potenciales de acción de células tratadas con colchicina por una hora, fueron similares a los de células control (Fig. 16A y B). Los resultados obtenidos de neuronas incubadas con colchicina fueron similares, con concentraciones de 10 ó 100  $\mu\text{M}$ . En las siete neuronas estudiadas la fluorescencia no aumentó por encima del 10% en los 500 segundos después del inicio de la estimulación eléctrica en presencia de FM1-43 (Fig. 17A y B). Como se observa en la figura 17C, al inicio de la estimulación eléctrica no hubo un aumento en la fluorescencia en la mayoría de las células y en una de ellas la fluorescencia se redujo un 2%, probablemente debido al blanqueamiento del colorante. Esto muestra que en presencia de la colchicina se eliminaron todos los componentes de la secreción en las células estudiadas.



**Figura 16.** El tratamiento con colchicina eliminó el aumento en fluorescencia en respuesta a la estimulación eléctrica. (A) Comparación de los trenes de impulsos evocados en una célula control y otra tratada con colchicina por pulsos cuadrados de corriente. (B) Primeros (izquierda) y últimos (derecha) potenciales de acción de los trenes en A, con y sin colchicina, ampliados y sobrepuestos.

Después de 500 segundos del primer tren, el incremento medio de fluorescencia fue de  $4.96 \% \pm 1.74$  ( $n=7$ ). Los porcentajes de fluorescencia promedio entre las células control y las tratadas con colchicina (Fig. 17D), tuvieron una diferencia significativa, de acuerdo con la prueba no paramétrica de Wilcoxon de una sola cola ( $P<0.0001$ ). El porcentaje final de fluorescencia (Fig. 17E) también tuvo diferencias significativas entre las neuronas control y las tratadas con colchicina usando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney de una sola cola ( $P=0.0002$ ).

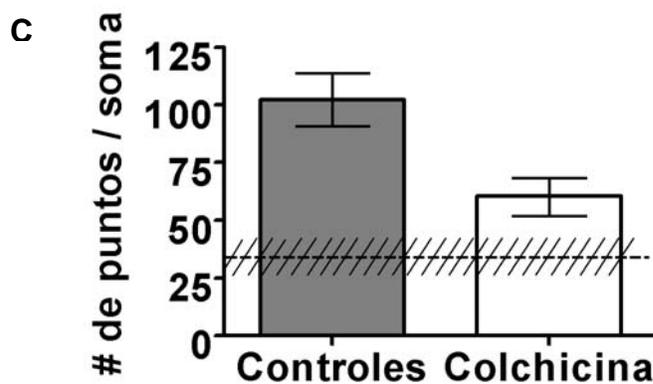
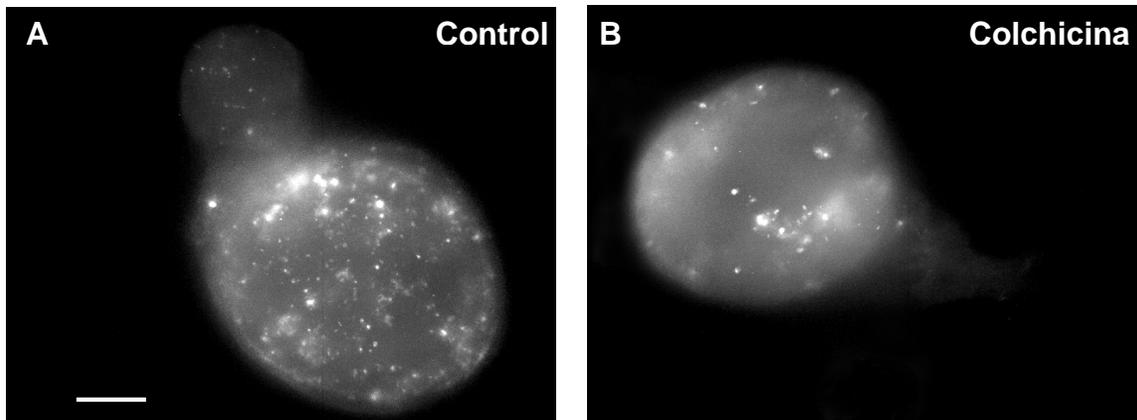


**Figura 17.** (A) Secuencia de imágenes de fluorescencia de una neurona de Retzius tratada con colchicina antes y durante la estimulación eléctrica. La barra mide 40  $\mu\text{m}$ . (B) Cinéticas de la fluorescencia en el soma de neuronas de Retzius en función del tiempo, antes y durante la estimulación eléctrica, y a una escala aumentada (C). (D) Promedio de los cambios en fluorescencia en células control,  $n=9$  y células tratadas con colchicina,  $n=7$ . (E) Porcentaje de fluorescencia final después de 500 segundos de iniciada la estimulación eléctrica. Cada cabeza de flecha representa un tren de impulsos.

### **La endocitosis es menor en las células tratadas con colchicina.**

Para averiguar si la endocitosis posterior a la exocitosis también es dependiente de los microtúbulos, se cuantificó la cantidad de puntos fluorescentes específicos en el cuerpo celular. Para ello se retiró el colorante del medio externo, lavando las neuronas por diez minutos con solución normal. De este modo se puede revelar un patrón característico de puntos fluorescentes, cada uno de los cuales corresponde a un cúmulo vesicular internado (Trueta, *et al.*, 2003). En este caso, se hicieron imágenes a partir de un barrido en el eje “z” (Fig. 18A y B).

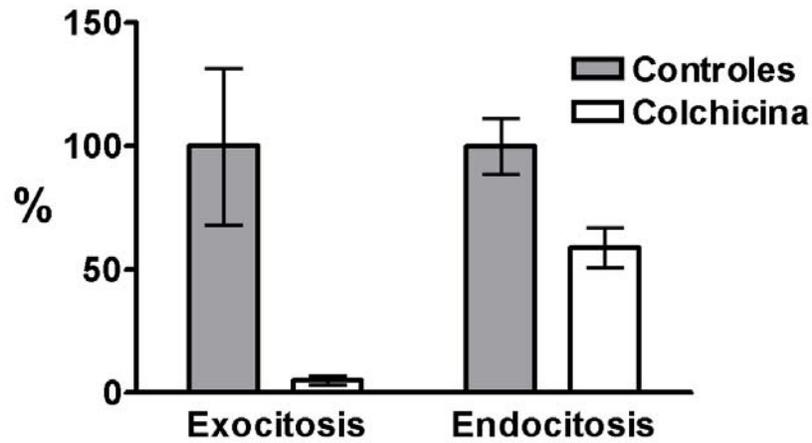
A partir de estas series de imágenes se cuantificó la cantidad de puntos fluorescentes, considerando las características definidas por Trueta, *et al.* (2003, 2004). Para células control el número promedio fue de  $102.3 \pm 11.55$  puntos por soma ( $n=7$ ), mientras que en las células tratadas con colchicina, la media fue 41% menor, o sea  $60.29 \pm 8.12$  puntos por soma ( $n=7$ ; Fig. 18C). Se aplicó una prueba t de Student no pareada de una cola y se obtuvo una diferencia significativa entre estos dos promedios ( $P= 0.0058$ ). Dado que el número de puntos en células control es similar al reportado por Trueta, *et al.*, 2003, comparamos nuestros datos con los de dicha publicación. En este caso, el número de puntos por soma en células tratadas con colchicina es mayor al observado en una secreción basal ( $34 \pm 8$ ;  $P= 0.0178$ ), cuando las neuronas se incubaron con el colorante en ausencia de estimulación, con estimulación a 1 Hz o a 20 Hz en presencia de magnesio en lugar de calcio.



**Figura 18.** El número de puntos fluorescentes después de la estimulación eléctrica fue menor en células tratadas con colchicina. En A (neurona control) y B (neurona tratada con colchicina), se muestran las reconstrucciones X, Y, Z con el patrón de puntos fluorescentes revelado después del lavado del colorante FM1-43. La escala es 20  $\mu\text{m}$ . (C) El número de puntos fluorescentes por soma en células tratadas con colchicina (blanco,  $60.29 \pm 8.12$ ) es menor que en células control (gris,  $102.3 \pm 11.55$ ), pero es mayor que el observado en una secreción basal (línea punteada,  $34.0 \pm 8.0$ , tomado de Trueta, 2003). Las medias de los puntos fluorescentes por soma fueron diferentes estadísticamente de acuerdo a la prueba de t de Student de una cola.

El tratamiento con colchicina tuvo un efecto menor en la endocitosis que en la exocitosis (Fig. 19). Esto es que la dependencia de los microtúbulos es menor en la endocitosis. Por ello se puede sugerir que los mecanismos que acoplan a la exocitosis con la endocitosis son independientes con respecto a los microtúbulos. Entonces una posible explicación es que la estimulación eléctrica puede activar la endocitosis a niveles mayores

que los basales aún cuando las células hayan sido tratadas con colchicina y no haya habido exocitosis.



**Figura 19.** Promedio normalizado con respecto a las neuronas control para la intensidad de fluorescencia (Exocitosis) y el número de puntos por soma (Endocitosis), en células control y tratadas con colchicina. Al afectar a los microtúbulos, la exocitosis alcanzó solamente el 5.03 % del valor en neuronas control, mientras que la endocitosis fue del 58.94%.

## DISCUSIÓN

### **La secreción depende de varios factores que afectan su cinética.**

La secreción somática de serotonina inducida con cafeína, tuvo una cinética logarítmica, diferente de la multifásica, característica de neuronas estimuladas eléctricamente. Estas diferencias parecen estar dadas por la regulación en la entrada de calcio.

Los canales de calcio somáticos en la neurona de Retzius, estudiados mediante la técnica de “Loose Patch Clamp”, tienen una densidad más baja que en el axón primario (Fernández-de-Miguel, *et al.*, 1992) y se distribuyen en cúmulos (Fernández de Miguel, datos no publicados). De esta manera, al entrar calcio extracelular ante estimulaciones de alta frecuencia, en las regiones cercanas a los cúmulos se formarían microdominios de alta concentración (Llinás, *et al.*, 1992) que podrían ser suficientes para activar los motores que movilizan a las vesículas hacia la membrana, así como la propia exocitosis (Becherer, *et al.*, 2003). Sin embargo, la secreción somática, no sólo depende de la entrada de calcio extracelular, sino que también requiere de la liberación del calcio intracelular (Trueta, *et al.*, 2004).

La microscopía electrónica muestra que el retículo endoplásmico está distribuido a todos niveles dentro del soma celular, con una capa cercana a la membrana (Trueta, *et al.*, 2004). Entonces, cuando se estimula eléctricamente se podría inducir la liberación escalonada de calcio del retículo endoplásmico. Al estimular eléctricamente a la neurona, la entrada de calcio extracelular activaría la liberación de calcio del retículo cercano a la membrana. Los pulsos de calcio provenientes de las reservas internas alcanzarían fragmentos de retículo endoplásmico distribuidos al interior de la célula, provocando la liberación en pasos subsecuentes. Con esto los motores moleculares podrían activarse de

forma gradual y los cúmulos vesiculares iniciarían su movilización hacia la membrana de forma escalonada dependiendo de su distancia a la membrana plasmática.

La activación de un motor de cinesina por la elevación de calcio, podría darse al propiciar su acople con las vesículas. La calsyntenina, que es una proteína sensible a calcio unida a las vesículas secretoras, regularía la unión de la carga con la cinesina (Konecna, *et al.*, 2006). Al acoplarse el motor a la carga vesicular, éste sería capaz de desplazarla a lo largo del microtúbulo en presencia de ATP. Proteínas como la calmodulina, que podría estar unida a la cadena ligera de la cinesina, regularían el desplazamiento de la proteína en el microtúbulo (Matthies, *et al.*, 1993).

La entrada de calcio extracelular podría activar a los motores de fusión vesicular y regular la liberación al nivel de una sola vesícula (Becherer, *et al.*, 2003), así la estimulación eléctrica sería suficiente para provocar la fusión en las vesículas adyacentes a la membrana. Los mecanismos de fusión vesicular podrían ser reforzados por la liberación de calcio intracelular inducida por calcio, siempre y cuando esta liberación lograra aumentar la concentración de calcio en las cercanías de la membrana.

La estimulación con cafeína activaría casi simultáneamente la liberación de calcio en todo el retículo endoplásmico y la concentración del ión se incrementaría repentinamente, por lo que los motores de fusión vesicular podrían activarse constantemente, mientras que los motores moleculares asociados al citoesqueleto podrían desplazar las vesículas hacia la membrana a una tasa constante. El período de saturación de la secreción estaría reflejando la máxima secreción que puede darse para una célula determinada, a altas concentraciones de calcio intracelular. Así se favorecería inmediatamente la movilización de todos los cúmulos, incluso de los más internos. Por lo tanto, los cúmulos vesiculares llegarían en menos tiempo a la membrana.

La cinética logarítmica de las curvas de fluorescencia de neuronas estimuladas con cafeína refleja un proceso en el cual un factor es el determinante para su velocidad. En estas condiciones se produce la liberación simultánea del calcio intracelular, induciendo aumentos en la concentración del calcio que posiblemente alcanzan la saturación, y activando los motores moleculares y la fusión vesicular. También se obtiene que la velocidad de la secreción disminuye a lo largo del tiempo debido a que los factores que participan en ella tienen una relación simple. Esta disminución puede ser explicada por el agotamiento de las vesículas liberables o por una posible disminución de la energía necesaria para el funcionamiento de los motores moleculares.

En las cinéticas de fluorescencia de células estimuladas eléctricamente, cuya respuesta eléctrica era caracterizada como saludable, los ajustes matemáticos dieron resultados variables, por lo que se sugiere que el proceso de secreción es sumamente complejo. En este caso la sucesión de trenes induce cambios en la cinética de liberación, posiblemente debidos a cooperatividad entre distintos elementos, como la entrada de calcio extracelular, la liberación escalonada del calcio intracelular y la activación de los motores de movilización y fusión vesicular.

### **Respuesta diferencial entre neuronas.**

Las neuronas control tuvieron una gran variabilidad en la secreción evocada por la estimulación eléctrica. Hubo células cuya fluorescencia se duplicó y en algunos casos se triplicó. También se encontraron dos neuronas en las que la fluorescencia sólo aumentó el 20% y en otra el 10%. Las cinéticas de incremento en la fluorescencia también fueron muy distintas de célula a célula. Algunas neuronas presentaron una liberación inicial rápida, mientras que otras secretaron lentamente e incrementaron su velocidad en fases posteriores.

Podemos pensar que las células pueden tener características fisiológicas relativamente diferentes, dependientes de la distribución intracelular de los cúmulos vesiculares en reposo. Si una célula presenta inicialmente más cúmulos de vesículas electrodensas adyacentes a la membrana, entonces la secreción inicial podría favorecerse. En caso contrario, si hay pocos cúmulos cercanos a la membrana, se necesitaría más tiempo y estimulaciones para hacer llegar los cúmulos distantes hacia la membrana. Entonces las neuronas de Retzius no tienen una forma estereotipada de secreción, lo cual se podría traducir en una respuesta diferencial bajo distintas condiciones en los ganglios presentes a lo largo del cordón nervioso. El hecho de que en células tratadas con colchicina no se haya visto esta variación en la secreción parece indicar que la colchicina, al desactivar el mecanismo de movilización homogeniza la respuesta.

### **Efecto del protocolo de estimulación.**

La aplicación de trenes repetidos podría regular la movilización de los cúmulos vesiculares. Si en un primer tren se secretan los cúmulos cercanos a la membrana, también se favorece el acercamiento de otros cúmulos a ella. Con trenes posteriores, se estimularía la secreción de los cúmulos de vesículas que antes estaban lejos de la membrana. Por otra parte, en células tratadas con colchicina se pudo descartar que la ausencia de secreción se debiera a una falla en la estimulación eléctrica dado que todos los trenes aplicados ocasionaron trenes de potenciales de acción de características similares a los de las neuronas control. De manera que la estimulación eléctrica no fue afectada por la colchicina.

### **Secreción diferencial en una misma célula.**

Las diferencias entre áreas independientes en una misma célula muestran que la secreción no es uniforme en todas las regiones de la membrana. Esto puede ser explicado por el hecho de que los cúmulos vesiculares llegan sólo a ciertas zonas de la membrana. Sin embargo, las cinéticas en diferentes zonas de una misma célula son bastante parecidas, y cambian de manera similar.

Posiblemente no detectamos diferencias tan marcadas entre distintas zonas por el tipo de microscopía que se usó. La microscopía de epifluorescencia tiene la desventaja de mostrar la luz fuera de foco en las tres dimensiones, lo cual contamina el plano de la imagen que se está tratando de observar. Por esto puede ser que los cambios en la fluorescencia hayan sido muy parecidos en distintas zonas de la célula, ya que la luz que se está cuantificando en un sitio proviene del mismo sitio y de las zonas circundantes. Por otra parte el tiempo entre una imagen y otra fue de 2 segundos, tiempo insuficiente para detectar eventos vesiculares del orden de los milisegundos. Así, la cinética del promedio de la fluorescencia en toda la célula parece ser un buen parámetro para estudiar dadas las condiciones del experimento.

### **Cinética promedio.**

La fluorescencia promedio de células estimuladas eléctricamente en ausencia de colchicina se incrementa en escalones suaves (Fig. 14B). Estos escalones coinciden con la aplicación de los trenes y también podrían ser explicadas por la organización intracelular de los cúmulos vesiculares a diferentes distancias (Fernández de Miguel, datos no publicados). Suponemos entonces que cada escalón mostraría la secreción de las pozas vesiculares que inicialmente se encontraban a diferentes distancias de la membrana. La liberación inicial

sería a partir de vesículas adosadas a la membrana, mientras que la primera joroba correspondería a la liberación de cúmulos provenientes del primer estrato, la siguiente joroba correspondería a un estrato vesicular más profundo. Entonces la estimulación eléctrica repetida estaría induciendo la movilización radial centrífuga gradual de los cúmulos vesiculares.

### **¿Por qué la secreción inicial se elimina con colchicina?**

De acuerdo a lo reportado por otros autores (Lang, *et al.* 2000; Oheim y Stühmer, 2000; Ñeco, *et al.*, 2003) los filamentos de actina pueden ser vías de movilización vesicular en otros tipos celulares, sobre todo en las fases iniciales de la secreción, posiblemente afectando vesículas cercanas a la membrana plasmática. Por ello, una posibilidad era que la fase inicial en el incremento de fluorescencia, correspondiente a la secreción de las vesículas cercanas a la membrana, se mantuviera en presencia de colchicina.

Sin embargo, el hecho de que la secreción inicial junto con sus demás componentes hayan sido eliminados con el tratamiento con colchicina, parece indicar que los microtúbulos son esenciales incluso para el desplazamiento hacia la membrana de los cúmulos que se encuentran más cercanos a ella. De esta manera los microtúbulos podrían formar parte de la maquinaria de transporte a corta distancia. También parece que los microtúbulos son parte esencial en la estructura de zonas activas de liberación, como lo indica la microscopía electrónica (Fig. 5).

Otra posibilidad es que el desacople de los microtúbulos afecte la distribución de los canales de calcio. Se sabe que los canales de sodio y potasio permanecen inmóviles en la membrana, manteniendo su distribución, que en algunos casos consiste en parches (Stühmer y Almers, 1982; Weiss, *et al.*, 2005). Pero probablemente al afectar al

citoesqueleto se pueda alterar la distribución y densidad de los canales iónicos, como lo indican estudios con inhibidores del motor de dineína o despolimerizadores del citoesqueleto (Choi, *et al.*, 2005; Leach, *et al.*, 2005). Entonces, si la colchicina afecta la distribución de los canales de calcio y no se logran formar los microdominios de calcio, no se alcanzarían las altas concentraciones en zonas cercanas a la membrana, afectando con ello la fusión vesicular. Sin embargo no tendríamos suficiente resolución para detectarlo. Esto es porque sólo vemos si hubo o no secreción, pero no podemos saber en qué momento se afecta la secreción, si en el transporte o en la fusión vesicular.

Por otra parte las vesículas adyacentes a la membrana pueden liberarse de forma constitutiva, es decir sin necesidad de estimulación, dado que existe una endocitosis basal (Trueta, *et al.*, 2003). Así, bajo nuestras condiciones de estudio, si esta liberación basal es muy lenta, sólo podría ser detectada con tiempos de registro óptico mucho más largos que los usados.

### **Diferencia entre las dinámicas de la exocitosis y la endocitosis.**

Se sabe que los movimientos de los paquetes de dinamina en la membrana son dependientes de los microtúbulos (Tsuboi, *et al.*, 2002), lo cual apoya el hecho de que la endocitosis en la secreción somática de serotonina haya sido afectada por la despolimerización de los microtúbulos. Sin embargo, ésta no llegó a eliminarse con el tratamiento con colchicina, por lo que la estimulación eléctrica activa la endocitosis a pesar del tratamiento con colchicina.

Por otra parte, aunque la exocitosis y la endocitosis estén acopladas por una cascada de señalización, el hecho de que en respuesta a la estimulación exista endocitosis por encima de los niveles basales, aún cuando no hay exocitosis, parece indicar que la

endocitosis en vesículas secretoras no es una simple consecuencia de la exocitosis. Existen otras evidencias de que estos procesos son mecanismos independientes. Por ejemplo, los motores que transportan a las vesículas hacia la periferia de la célula para su fusión con la membrana plasmática usan ATP, mientras que la dinamina cierra los poros vesiculares usando GTP. Por otra parte, la dinamina tiene una dependencia de calcio a diferentes concentraciones que los motores de fusión vesicular, por lo que sus sensores de calcio parecen ser de distinta naturaleza (Marks y McMahon, 1998). Además, las proteínas que constituyen la membrana de las vesículas exocitadas se difunden a través de la membrana plasmática, mientras que las vesículas posteriormente exocitadas están compuestas principalmente por proteínas que formaban parte de la membrana plasmática (Wienisch y Klingauf, 2006). Entonces de lo anterior se obtiene que la endocitosis está más acoplada a la estimulación eléctrica y el calcio intracelular que a los microtúbulos y la exocitosis.

### **Similitudes con la secreción en células endocrina.**

Como se mencionó anteriormente, las características de la secreción somática de serotonina en la neurona de Retzius son similares a las de células endocrinas. A este esquema contribuimos mostrando la dependencia al citoesqueleto, como se ha visto también en células cromafines (Ñeco, *et al.*, 2003), células cebadas (Smith, *et al.*, 2003) y en células Vero transfectadas con cromogranina humana (Wacker, *et al.*, 1997). En estas últimas, el tratamiento con nocodazol retarda y reduce a la mitad la secreción. Posiblemente el tiempo de registro usado en las células de Retzius no permite ver una secreción retardada en el tratamiento con colchicina. Con esto se puede pensar que este mecanismo de comunicación nerviosa está más relacionado con la comunicación neuroendocrina y sus orígenes

podrían ser más primitivos que los de la comunicación sináptica, considerándose como un tipo de secreción paracrina.

### **Perspectivas.**

Con las distintas cinéticas de aumento en fluorescencia se evaluaron de manera preliminar las ecuaciones matemáticas a las cuales se podrían ajustar, para conocer como es el proceso de secreción y la naturaleza de la maquinaria que se involucra con él. Dado que son cinéticas diferentes y presentan características particulares, falta por hacer un estudio detallado. Por ello se tiene planeado realizar un modelo matemático que considere las variables biológicas en el fenómeno y las traduzca a variables matemáticas, de manera que pueda describir lo que sucede en la experimentación.

Se han considerado varios experimentos que podrían realizarse en este sistema de secreción y que den información relevante acerca del fenómeno de la secreción somática de neurotransmisores, por ejemplo, probar fármacos que afecten a los microtúbulos pero cuya acción sea reversible. Esto para saber si en una misma célula la secreción puede restablecerse después de haber retirado el fármaco. Un paso siguiente sería evaluar la relación de los filamentos de actina en el transporte vesicular con ayuda de un fármaco despolimerizador de microfilamentos. Otro experimento podría consistir en visualizar los motores moleculares con anticuerpos unidos a marcadores fluorescentes y relacionarlos con la movilización de vesículas marcadas. También se podría desactivar a la kinesina, que al parecer es la responsable del transporte de vesículas para su secreción. Esto ofrecería una evidencia más directa del motor molecular que interviene en la exocitosis. Una posibilidad sería usar un análogo de ATP no hidrolizable. También podría usarse un inhibidor específico para la kinesina (Sackowicz, *et al.*, 1998). Por otra parte sería útil estudiar como

se distribuyen los complejos moleculares que se involucran con el marcaje de los sitios de exocitosis, como el complejo SNARE o el complejo Exocyst. Con esto se podría ubicar si hay sitios preferenciales de secreción como lo sugiere la microscopía electrónica.

## CONCLUSIONES.

La cinética de secreción somática de serotonina en la neurona de Retzius es diferente en células estimuladas con cafeína que en células estimuladas eléctricamente. Ya que la liberación directa de las reservas internas de calcio produce una secreción rápida con una cinética logarítmica, mientras que la estimulación eléctrica a altas frecuencias tiene como consecuencia una secreción inicial lenta que se ve incrementada a lo largo del tiempo y en respuesta a la aplicación de más estímulos. Esto parece indicar que la secreción somática ante la estimulación eléctrica es un proceso con factores cooperativos.

En células estimuladas eléctricamente hubo diferencias en los incrementos de fluorescencia en diferentes áreas de una misma neurona. Esto sugiere que la secreción de serotonina tiene zonas preferenciales y coincide con lo demostrado por la microscopía electrónica, que muestra vesículas agrupadas en cúmulos a distintos niveles de la membrana plasmática.

La secreción somática de serotonina fue afectada por la despolimerización de los microtúbulos al punto de anular la secreción y desacoplarla de la estimulación eléctrica. De esto se obtiene que los microtúbulos participan en la movilización de cúmulos vesiculares hacia la membrana celular para su exocitosis.

La despolimerización de los microtúbulos afecta a la endocitosis en menor medida que la exocitosis. Por lo que la endocitosis es más dependiente de la estimulación eléctrica y la entrada de calcio que de los microtúbulos. Entonces, el hecho de que la endocitosis y la exocitosis presenten una diferente dependencia de microtúbulos sugiere que estos dos procesos son independientes entre sí.

## BIBLIOGRAFÍA.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. *Molecular biology of the cell*. 4<sup>a</sup> ed. Garland Science. E.U.A. pp. 712-723, 757-766, 907-968.

Angelson, J. K., Betz, W. J. 1997. Monitoring secretion in real time: capacitance, amperometry and fluorescence compared. *Trends Neurosci.* **20**:281-287.

Arbas, E. A., Calabrese, R. L. 1984. Rate modification in the heartbeat central pattern generator of the medicinal leech. *J. Comp. Physiol. A.* **155**:783-794.

Asbury, C. L. 2005. Kinesin: world's tiniest biped. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**:89-97.

Bai, R., Pei, X. F., Boye, O., Getahun, Z., Grover, S., Bekisz, J., Nguyen, N. Y., Brossi, A., Hamel, E. 1996. Identification of cysteine 354 of beta tubulin as part of the binding site for the A ring of colchicine. *J. Biol. Chem.* **271**:12639-12645.

Bailey, C. H., Chen, M., Keller, F., Kandel, E. 1992. Serotonin-mediated endocytosis of apCAM: an early step of learning related synaptic growth in *Aplysia*. *Science.* **256**:645-649.

Becherer, U., Moser, T., Stühmer, W., Oheim, M. 2003. Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nature Neurosci.* **6(8)**:846-853.

Bergen, L. G., Borisy, G.G. 1980. Head-to-tail polymerization of microtubules *in vitro*. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J. Cell Biol.* **84**:141-150.

Bloom, G. S. 1992. Motor proteins for cytoplasmic microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**:66-73.

Borisy, G. G. 1978 . Polarity of microtubules of the mitotic spindle. *J. Mol. Biol.* **124**:565-570.

Borisy, G. G., Taylor, E. W. 1967. The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine to cellular protein. *J. Cell Biol.* **34**:525-533

Bowser, R., Muller, H., Govindan, B., Novick, P. 1992. Sec8p and Sec15p are components of a plasma membrane-associated 19.5S particle that may function downstream of Sec4p to control exocytosis. *J. Cell Biol.* **118**:1041-1056.

Bunin, M. A., Wightman, R. M. 1999. Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of 5-HT. *Trends. Neurosci.* **22**:377-382.

Burrell, B. D., Sahley C. L. 2005. Serotonin mediates learning-induced potentiation of excitability. *J Neurophysiol.* **94**:4002-4010.

Burrell, B. D., Sahley C. L, Muller, K. J. 2001. Non-associative learning and serotonin induce similar bi-directional changes in excitability of a neuron critical for learning in the medicinal leech. *J. Neurosci.* **21(4)**:1401–1412.

Bruns, D., Jahn, R. 1995. Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature.* **377(7)**:62-65.

Bruns, D., Riedel, D., Klingauf, J., Jahn, R. 2000. Quantal release of serotonin. *Neuron.* **28**:205-220.

Case, R. B., Rice, S., Hart, C. L., Ly, B., Vale, R. D. 2000. Role of the kinesin neck linker and catalytic core in microtubule-based motility. *Curr. Biol.* **10**:157–160.

Chao, M. Y., Komatsu, H., Fukuto, H. S., Dionne, H. M., Hart, A. C. 2004. Feeding status and serotonin rapidly and reversibly modulate a *Caenorhabditis elegans* chemosensory circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101(43)**:15512–15517.

Chen, G., Gavin, P. F., Luo, G., Ewing, A. G. 1995. Observation and quantitation of exocytosis from the cell body of fully developed neuron in *Planorbis corneus*. *J. Neurosci.* **15(11)**:7747-7755.

Choi, W. S., Khurana, A., Mathur, R., Viswanathan, V., Steele, D. F., Fedida, D. 2005. Kv1.5 surface expression is modulated by retrograde trafficking of newly endocytosed channels by the dynein motor. *Circ. Res.* **97**:363-371.

Coy, D. L., Hancock, W. O., Wagenbach, M., Howard, J. 1999. Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nature Cell Biol.* **1**:288-292.

De-Miguel, F. F., Trueta, C. 2005. Synaptic and extrasynaptic secretion of serotonin. *Cell. Mol. Neurobiol.* **25(2)**:297-312.

Dent, E. Gertler, F. B., 2003. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron.* **40**:209-227.

Díaz, J. F., Pantos, E., Bordas, J., Andreu, J. M. 1994. Solution structure of GDP-tubulin double rings to 3 nm resolution and comparison with microtubules. *J. Mol. Biol.* **238**:214–225.

Dietzel, I.D., Dreapeau, P. Nicholls, JG. 1986. Voltage-dependent Ca influx into identified leech neurones. *J. Physiol.* **372**:191-205.

Donelan, M., J., Morfini, G., Julyan, R., Sommers, S., Hays, L., Kajio, H., Briaud, I., Easom, R. A., Molkentin, J. D., Brady, S. T. 2002. Ca-dependent dephosphorylation of kinesin heavy chain on  $\beta$ -granules in pancreatic  $\beta$ -cells. Implications for regulated  $\beta$ -granule transport and insulin exocytosis. *J. Biol. Chem.* **277(27)**:24232–24242.

- Downing, K., Nogales, E. 1999. Crystallographic structure of tubulin: implication for dynamics and drug binding. *Cell Struc. Func.* **24**:269-275.
- Eckert, R. 1963. Electrical interaction of paired ganglion cells in the leech. *J. Gen. Physiol.* **46**:573-587.
- Feldman, J. K., Mitchell, G. S., Nattie, E. E. 2003. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu. Rev. Neurosci.* 2003. **26**:239–266.
- Fernández-de-Miguel, F., Cooper, R. L., Adams, W. B. 1992. Synaptogenesis and calcium current distribution in cultured leech neurons. *Proc. R. Soc. Lond.* **B 247**:215-221.
- Friedman, D. S., Vale, R. D. 1999. Single-molecule analysis of kinesin motility reveals regulation by the cargobinding tail domain. *Nature Cell Biol.* **1**:293-297.
- García-Pérez, E., Vargas-Caballero, M., Velázquez-Ulloa, N., Minzoni, A., De-Miguel, F. F. 2004. Synaptic integration in electrically-coupled neurons. *Biophys. J.* **86**:646-655.
- Gaspar, P., Cases, O., Maroteaux, L. 2003. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Rev. Neurosci.* **4**:1002-1012.
- Goldstein, L. S. B., Yang, Z. 2000. Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**:39–71.
- Gross, C., Hen, R. 2004. The developmental origins of anxiety. *Nature Rev. Neurosci.* **5**:545-552.
- Hagiwara, S., Morita, H. 1962. Electrotonic transmission between two nerve cells in leech ganglion. *J. Neurophysiol.* **25**:721-731.
- Harris-Warrick, R. M., Kravitz, E. A. 1984. Cellular mechanisms for modulation of posture by octopamine and serotonin in the lobster. *J. Neurosci.* **4(8)**:1976-1993.
- Hattox, A., Li, Y., Keller, A. 2003. Serotonin regulates rhythmic whisking. *Neuron.* **39**:343–352.
- Holy, T. E., Leibler, S. 1994. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:5682-5685.
- Huang, L. Y., Neher, E. 1996. Ca-dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons. *Neuron.* **17**:135-145.
- Jaffe, E. H., Marty, A., Schulte, A., Chow, R. H. 1998. Extrasynaptic vesicular transmitter release from the somata of substantia nigra neurons in rat midbrain slices. *J. Neurosci.* **18(10)**:3548–3553.

- Jordan, M. A. 2002. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents*. **2**:1-17.
- Jordan, M. A., Wilson, L. 1998. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**:123-130.
- Kamal, A., Goldstein, L. S. B. 2000. Connecting vesicle transport to the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:503–508.
- Konecna, A., Frischknecht, R., Kinter, J., Ludwig, A., Steuble, M., Meskenaite, V., Indermühle, M., Engel, M., Cen, C., Mateos, J. M., Peter Streit, P., Sonderegger, P. 2006. Calsyntenin-1 docks vesicular cargo to kinesin-1. *Mol. Biol. Cell.* **17**:3651–3663.
- Kosaka, T., Ikeda, K. 1983. Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* **14**:207-225.
- Kravitz, E. A. 1988. Hormonal control of behavior: Amines and the bias of behavioral output in lobster. *Science*. **241**:1775-1781.
- Kristan Jr., W. B., Calabrese, R. L., Friesen, W. O. 2005. Neuronal control of leech behavior. *Prog. Neurobiol.* **76**:279–327.
- Kristan, Jr. W. B., McGirr, S. J., Simpson, G. V. 1982. Behavioral and mechanosensory neurone responses to skin stimulation in leeches. *J. Exp. Biol.* **96**:143-160.
- Kristan, Jr. W. B., Nusbaum, M. P. 1983. The dual role of serotonin in leech swimming. *J. Physiol. Paris.* **78**:743-747.
- Kuffler, D. P., Nicholls, J., Drapeau, P. 1987. Transmitter localization and vesicle turnover at serotonergic synapse between identified leech neurons in culture. *J. Comp. Neurol.* **256(4)**:516-526.
- Kumar, J., Yu, H., and Sheetz, M. P. 1995. Kinectin, an essential anchor for kinesin-driven vesicle motility. *Science*. **267**:1834–1837
- Kumar, J., Erickson, H., Sheetz, M. 1998. Ultra-structural and biochemical properties of the 120 kDa form of kinectin in chicken. *J. Biol. Chem.* **273**:31738-31743.
- Lang, T., Wacker, I., Wunderlich, I., Rohrbach, A., Giese, G., Soldati, T., Almers, W. 2000. Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys. J.* **78**:2863-2877.
- Leach, R. N., Desai, J. C., Orchard, C. H. 2005. Effect of cytoskeleton disruptors on L-type Ca channel distribution in rat ventricular myocytes. *Cell Calcium*. **38**:515–526
- Lent, C. M., Ono, J., Keysre, K. T., Karten, H. J. 1979. Identification of serotonin within vital-stained neurons from leech ganglia. *J. Neurochem.* **32**:1559-1563.

- Lindesmith, L., McIlvain, J. M. Jr., Yair Argon, Y., Sheetz, M. P. Phosphotransferases associated with the regulation of kinesin motor activity. *J. Biol. Chem.* **272**(36):22929–22933.
- Livingstone, M. S., Harris-Warrick, R. M., Kravitz, E. A. 1980. Serotonin and octopamine produce opposite postures in lobsters. *Science.* **208**:76-79
- Llinás, R., Sugimori, M., Silver, R. B. 1992. Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science.* **256**:677-679.
- Mann, J. 2003. Neurobiology of suicidal behaviour. *Nature Rev. Neurosci.* **4**:819-828.
- Mann, Kenneth Henry. 1961. *LEECHES (HIRUDINEA). Their structure, physiology, ecology and embriology.* Pergamon Press. London, G. B. 201 pp.
- Margolis, R., Wilson, L. 1997. Addition of colchicine-tubulin complex to microtubules ends: the mechanism of substoichiometric colchicine poisoning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**(8):3466-3470.
- Marks, B., McMahon, H. 1998. Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr. Biol.* **8**:740–749.
- Matthies, H. J. G., Miller, R. J., Palfrey, H. C. 1993. Calmodulin binding to and cAMP-dependent phosphorylation of kinesin light chains modulate kinesin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **268**(15):11176-11187.
- Miao, H., Rubakhin, S. S., Sweedler, J. V. 2003. Analysis of serotonin release from single neuron soma using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence with a pulsed deep-UV NeCu laser. *Anal. Bioanal. Chem.* **377**:1007-1013.
- Mitchinson, T. J. 1993. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science.* **261**:1044-1047.
- Mitchison, T., Kirschner, M. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* **312**:237–242.
- Muallem, S., Kwiatkowska, K., Xu, X., Yin, H. L. 1995. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J. Cell Biol.* **128**(4):589-598.
- Moos, F., Freund-Mercier, M. J., Guerne, Y., Guerne, J. M., Stoeckel, M. E., Richard, P. 1984. Release of oxytocin and vasopressin by magnocellular nuclei *in vitro*: specific facilitatory effect of oxytocin on its own release. *J. Endocrinol.* **102**:63-72.
- Nelson, R. J., Chiavegatto, S. 2001. Molecular basis of aggression. *Trends Neurosci.* **24**(12):713-719.

- Nguyen, D., Sargent, P. 2002. Synaptic vesicle recycling at two classes of release sites in giant nerve terminals of the embryonic chicken ciliary ganglion. *J. Comp. Neurol.* **448**:128–137.
- Nicholls, D. G. 1994. *Proteins, transmitters and synapses*. Blackwell Science. Gran Bretaña. pp. 200-206.
- Nicholls, J. G., Martin, A. R., Wallace, B. G., Fuchs, P. A. 2001. *From neuron to brain*. 4<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates. E.U.A. 580 p.
- Nogales, E., Wolf, S. G., Downing, K. H. 1998. Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. **391**:199-203. Corrección **393**:191.
- Nunez, J., Fellous, A., Francon, J., Lennon, A. M. 1979. Competitive inhibition of colchicine binding to tubulin by microtubule-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76(1)**:86-90.
- Nusbaum, M. P. 1986. Synaptic basis of swim initiation in the leech III. Synaptic effects of serotonin-containing interneurons (cells 21 and 61) on swim CPG neurons (cells 18 and 208). *J. Exp. Biol.* **122**:303-321.
- Nusbaum, M. P., Kristan, Jr. W. B. 1986. Swim initiation in the leech by serotonin containing interneurons, cells 21 and 61. *J. exp. Biol.* **122**:277-302.
- Nuttley, W. M., Atkinson-Leadbetter, K. P., van der Kooy, D. 2002. Serotonin mediates food-odor associative learning in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99(19)**:12449–12454.
- Ñeco, P., Giner, D., Francés, M. M., Viniestra, S., Gutiérrez, L. M. 2003. Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci.* **18**:733-742.
- Ovsepian, S. V., Vesselkin, N. P. 2006. Serotonergic modulation of synaptic transmission and action potential firing in frog motoneurons. *Brain Res.* **1102**:71 – 77.
- Oheim, M., Stühmer, W. 2000. Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur. Biophys. J.* **29**:67-89.
- Puopolo, M., Hochstetler, S. E., Gustincich, S., Wightman, R. M., Raviola, E. 2001. Extrasynaptic release of dopamine in a retinal neuron: activity dependence and transmitter modulation. *Neuron*. **30**:211–225.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., Lamantia, A. S., McNamara, J. O., Williams, S. M. 2001. *Neuroscience*. 2<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. E.U.A.
- Rahman, A., Kamal, A., Roberts, E. A., Goldstein, L. S. B. 1999. Defective kinesin heavy chain behavior in mouse kinesin light chain mutants. *J. Cell Biol.* **146(6)**:1277–1287.

- Ramaswami, M., Krishnan, K. S., Kelly, R. B. 1994. Intermediates in synaptic vesicle recycling revealed by optical imaging of *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron*. **13**:363-375.
- Richerson, G. B. 2004. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nature Rev. Neurosci.* **5**:449-461.
- Rose, M. D., Biggins, S., Satterwhite, L. L. 1993. Unraveling the tangled web at the microtubule-organizing center. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:105-115.
- Rude, S., Coggeshall, E., Van Order, L. S., III. 1969. Chemical and ultrastructural identification of 5-hydroxytryptamine in an identified neuron. *J. Cell. Biol.* **41**:832-854.
- Sakato, M., King, S. M. 2003. Calcium regulates ATP-sensitive microtubule binding by *Chlamydomonas* outer arm dynein. *J. Biol. Chem.* **278(44)**:43571–43579.
- Sakowicz, R., Berdelis, M. S., Ray, K., Blackburn, C. L., Hopmann, C., Faulkner, D. J., Goldstein, L. S. B. 1998. A marine natural product inhibitor of kinesin motors. *Science*. **280**:292-295.
- Salmon, E. D., McKeel, M., Hays, T. 1984. Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle *in vivo* measured by blocking polymerization with colchicine. *J. Cell Biol.* **84**:1441-150.
- Schafer, D.A. 2004. Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic*. **5**:463–469.
- Sheetz, M. P. 1996. Microtubule motor complexes moving membranous organelles. *Cell Struc. Func.* **21**:369-373.
- Sheetz, M. P. 1999. Motor and cargo interactions. *Eur. J. Biochem.* **262**:19-25.
- Siegel, G. J. Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. W., Uhler, M. D. 1999. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. 6<sup>a</sup> Ed. Lippincott–Raven Publishers. E. U. A.
- Skoufias, D. A., Wilson, L. 1992. Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes. *Biochemistry* . **31**:738-746.
- Smith, A. J., Pfeiffer, J. R., Zhang, J. 2003. Microtubule-dependent transport of secretory vesicles in RBL-2H3 cells. *Traffic*. **4**:302-312.
- Smith, C. B., Betz, W. J. 1996. Simultaneous independent measurement of endocytosis and exocytosis. *Nature*. **380**, 531–534.

- Schnapp, B.J. and Reese, T.S. 1989. Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**:1548-1552.
- Soldo, B. L., Giovannucci, D. R., Stuenkel, E. L., Moises, H. C. 2004. Ca and frequency dependence of exocytosis in isolated somata of magnocellular supraoptic neurones of the rat hypothalamus. *J. Physiol.* **555(3)**:699-711.
- Steyer, J. A., Almers, W. 1999. Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **76**:2262–2271.
- Steyer, J. A., Horstmann, H., Almers, W. 1997. Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature.* **388**:474-478.
- Stewart, M. 1993. Intermediate filament structure and assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:3-11.
- Stock, M. F., Guerrero, J., Cobb, B., Eggers, C. T., Huang, T. G. Xun Li, X., Hackney, D. D. 1999. Formation of the compact conformation of kinesin requires a COOH-terminal heavy chain domain and inhibits microtubule-stimulated ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **74(21)**:14617–14623.
- Stühmer, W., Almers, W. 1982. Photobleaching through glass micropipettes: sodium channels without lateral mobility in the sarcolemma of frog skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:946-950
- Sun, X., Deng, J., Liu, L., Borjigin, J. 2002. Circadian 5-HT production regulated by adrenergic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99(7)**:4686–4691.
- Sun, Y. A, Poo, M. M. 1987. Evoked release of acetylcholine from the growing embryonic neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:2540-2544.
- Sze, J. Y., Victor, M., Loer, C., Shi, Y., Ruvkun, G. 2000. Food and metabolic signaling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature.* **403**:560-564.
- Trinczek, B., Ebner, A., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. 1999. Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J. Cell Sci.* **112**:2355-2367.
- Trueta, C., Méndez, B., De-Miguel, F. F. 2003. Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurons. *J. Physiol.* **547**:405-416.
- Trueta, C., Sánchez-Armass, S., Morales, M. A., De-Miguel, F. F. 2004. Calcium-induced calcium release contributes to somatic secretion of serotonin in leech *Retzius* neurons. *J. Neurobiol.* **61**:309-316.
- Tse, F. W., Tse, A., Hille, B., Horstmann, H., Almers, W. 1997. Local Ca release from internal stores controls exocytosis in pituitary gonadotrophs. *Neuron.* **18**:121–132.

- Tsuboi, T., Terakawa, S., Scalettar, B. A., Fantus, C., Roder, J., Jeromin, A. 2002. Sweeping model of dynamin activity. *J. Biol. Chem.* **277**(18):15957-15961.
- Vazquez, R. J., Howell, B., Yvon, A-M. C., Wadsworth, P., Cassimeris, L. 1997. Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell.* **8**:973-985.
- Vale, R. D., Reese, T. S., Sheetz, M. P. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell.* **42**:39-50.
- Vallee, R., Sheetz, M. 1996. Targeting of motor proteins. *Science.* **271**:1539-1544.
- Vega, I. E., Hsu, S. C. 2001. The exocyst complex associates with microtubules to mediate vesicle targeting and neurite outgrowth. *J. Neurosci.* **21**(11):3839-3848.
- Velázquez-Ulloa, N., Blackshaw, S. E., Szczupak, L., Trueta, C., García, E., De-Miguel, F. F. 2003. Convergence of mechanosensory inputs onto neuromodulatory serotonergic neurons in the leech. *J. Neurobiol.* **54**:604–617.
- Verhey, K. J., Lizotte, D. L., Abramson, T., Barenboim, L., Schnapp, B. J., Rapoport, T. A. 1998. Light chain-dependent regulation of kinesin's interaction with microtubules. *J. Cell Biol.* **143**(4):1053–1066.
- Vogt, L., Schrimpf, S. P., Meskenaite, V., Frischknecht, R., Kinter, J., Leone, D. P., Ziegler, U., and Sonderegger, P. 2001. Calsyntenin-1, a proteolytically processed postsynaptic membrane protein with a cytoplasmic calcium-binding domain. *Mol. Cell Neurosci.* **17**:151–166.
- Wacker, I., Kaether, C., Krömer, A., Migala, A., Almers, W., Gerdes, H. H. 1997. Microtubule-dependent transport of secretory visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J. Cell Sci.* **110**:1453-1463.
- Wang, H. W., Nogales, E. 2005. Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature.* **435**:911-915.
- Weiss, R. E., Roberts, W. M., Stühmer, W., Almers, W. 1986. Mobility of Voltage-dependent Ion Channels and Lectin Receptors in the Sarcolemma of Frog Skeletal Muscle *J. Gen. Physiol.* **87**(6): 955-983
- Wienisch, M., Klingauf, J. 2006. Vesicular proteins exocytosed and subsequently retrieved by compensatory endocytosis are nonidentical. *Nature Neurosci.* **9**(8):2006
- Willard, A. L. 1981. Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech. *J. Neurosci.* **1**(9):936-944.

Wilson, L., Panda, D., Jordan, M. A. 1999. Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the actions of cellular regulators. *Cell Struc. Func.* **24**:329-335.

Wittenberg, G., Loer, C. M., Adamo, S. A., Kristan, Jr. W. B. 1990. Segmental specialization of neuronal connectivity in the leech. *J. Comp. Physiol.* **167**:453– 459.

Zaidi, Z. F., Matthews, M. R. 1997. Exocytotic release from neuronal cell bodies, dendrites and nerve terminals in sympathetic ganglia of the rat, and its differential regulation. *Neuroscience.* **80(3)**:861-891.