



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

**MODELO CINÉTICO DE LA LIBERACIÓN DE TRANSMISOR QUÍMICO EN LA
UNIÓN NEUROMUSCULAR**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA)

PRESENTA:

ALEJANDRO MARTÍNEZ VALENCIA

TUTORES PRINCIPALES

DR. GUILLERMO RAMÍREZ SANTIAGO
INSTITUTO DE MATEMÁTICAS, UNAM.

DR. FRANCISCO RAFAEL FERNÁNDEZ DE MIGUEL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTOR

DR. DAVID PHILIP SANDERS
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO. MARZO, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi padre y a mi madre, por seguir apoyándome en todo lo necesario para que yo pudiera realizar la maestría, con todas las comodidades posible. Por darme alojamiento en casa y soportarme este último año de escritura de la tesis. Sin su apoyo, nada de esto hubiera sido posible.

Quiero también agradecer al Dr. Guillermo y al Dr. Paco por su apoyo a lo largo de estos tres años de trabajo intenso, en los cuales he aprendido muchas cosas de los dos, en especial, la forma de trabajar en una colaboración multidisciplinaria. Gracias por esas largas reuniones de discusión de la tesis, que al final fructificaron en este trabajo final de tesis.

También quiero agradecer a todos mis amigos y compañeros que me apoyaron, dándome palabras de aliento y ánimo cuando lo requería. Aquellas personas que soportaron mis frustraciones cuando las cosas no salían como esperaba. A Ariadna, Miriam, Memo, Pablo, Dariana, Jiménez y los que faltan, que de una u otra forma contribuyeron para que yo no perdiera la meta de terminar la maestría.

También quiero agradecer a los revisores de la tesis, al Dr. Leonardo Rodríguez-Sosa, al Dr. Rafael Barrio, al Dr. Antonmaría Minzoni y al Dr. Agustín Guerrero, por sus valiosos comentarios y correcciones que eventualmente hicieron que la calidad de la tesis mejorara sustancialmente.

Finalmente, quiero agradecer a CONACyT por la beca otorgada para la realización de esta maestría.

Índice general

Resumen	I
Abstract	II
Introducción	III
1. Fisiología de la sinapsis neuromuscular	1
1.1. Transmisión sináptica química	1
1.2. Actividad basal espontánea	3
1.3. Naturaleza estadística de la liberación cuántica	4
1.4. Plasticidad sináptica: procesos de facilitación y depresión	4
1.5. Mecanismo de exocitosis	6
1.6. Pozas vesiculares sinápticas	7
1.7. Hallazgos recientes	8
2. Modelo cinético	10
2.1. Objetivo	10
2.2. Modelo cinético	10
2.3. Ecuación cinética maestra	12
2.4. Algoritmo de Simulación Estocástica de Gillespie	14
3. Resultados	19
3.1. Actividad basal espontánea	20
3.2. Naturaleza estadística de la liberación cuántica	22
3.3. Facilitación y depresión sináptica	26
4. Discusión	31
5. Conclusiones	37
Apéndice	39
A. Otros Resultados	39
Bibliografía	44

Resumen

La teoría de la neurotransmisión se desarrolló utilizando principalmente a la unión neuromuscular como preparación de estudio. En ella se demostró experimentalmente que la llegada de un impulso a la terminal nerviosa induce la liberación de paquetes (*cuantos*) de transmisor acetilcolina. Un *cuanto* de transmisor – aproximadamente 7,000 moléculas almacenadas en vesículas sinápticas – se libera al fusionarse la membrana vesicular con la membrana celular. La liberación ocurre de forma tal que la probabilidad de fusión de una vesícula es independiente de las vesículas restantes. Se ha encontrado que la distribución del número de *cuantos* de transmisor liberados debido a estimulación eléctrica es consistente con una distribución de probabilidad de Poisson.

Hallazgos experimentales recientes en la sinapsis neuromuscular de rana, obtenidos por medio de tomografía electrónica, sugieren la existencia de patrones vesiculares estereotipados en el proceso exocitosis. Es decir, una vesícula anclada en la zona de liberación (estado *docking*) se encuentra al lado de otra vesícula próxima a la membrana celular (estado *priming*) y esta a su vez está junto a una vesícula en proceso de fusión vesicular con la membrana celular (estado *hemifusión*) y esta última está a lado de una vesícula totalmente fusionada que ha liberado el neurotransmisor.

Con base en este arreglo morfológico de las vesículas, en esta tesis se propone un modelo cinético de cuatro estados vesiculares. Analizando el modelo cinético mediante una ecuación cinética estocástica cuya solución se aproxima mediante caminatas aleatorias de acuerdo con el algoritmo de simulación estocástica propuesto por Gillespie, se reprodujo la actividad de liberación basal de la sinapsis, la respuesta evocada por la actividad eléctrica y los fenómenos de plasticidad como la facilitación y la depresión de la sinapsis neuromuscular de la rana y de mamífero. Este modelo cinético ofrece una nueva perspectiva para entender cuantitativamente los fenómenos subyacentes de la neurotransmisión química con base en las interacciones moleculares.

Abstract

The neurotransmission theory was built using the neuromuscular junction as a biological model. It was shown experimentally that upon arrival of an electrical impulse to the nerve terminal, it induces the release of synaptic vesicles, which contain the neurotransmitter acetylcholine. Each vesicle carries about 7,000 molecules of the neurotransmitter and because of this it is called a “*quantum*”. When the vesicle membrane fuses with the cell membrane the neurotransmitter is released into the extracellular space. This process occurs in such a way that the probability of fusion of a given vesicle is independent of the other fusion events. Upon recording many fusion events it is found that the number of “*quanta*” released follows a statistics consistent with a Poisson distribution.

Recent experimental findings that analyze the frog neuromuscular junction with electron tomography suggest that there exist some “stereotyped vesicle patterns” during the exocytosis process. It was observed that a vesicle in the unprimed pool is in a “docking state” which is followed by another vesicle in a “priming state” close to the cell membrane, this vesicle is also followed by another vesicle undergoing the hemifusion process –fusion process with the membrane cell–, and at the end a totally fused vesicle that has released its content is observed.

Based on these findings a four vesicle states kinetic model is introduced in this thesis. The model was analyzed with a stochastic kinetic equation whose solution is approximated by simulating “random walks” according to the Gillespie’s stochastic algorithm. This approach allowed us to reproduce the amounts of neurotransmitter released during the synaptic basal activity as well as the evoked response due to electrical activity. The model also reproduced the frog and mammals neuromuscular synaptic facilitation and depression phenomena. Thus, the kinetic model based on the molecular interactions offers a quantitative approach to understand chemical neurotransmission.

Introducción

El sistema neuromuscular posee células especializadas que hacen posible la recepción sensorial, la rápida comunicación interna y el movimiento reflejo de un animal cuando, por ejemplo, captura su alimento o huye de algún peligro.

Las señales neuronales se transmiten de una célula a otra a través de lugares especializados de contacto llamados sinapsis. La unión o sinapsis neuromuscular es la unión entre el axón de una neurona (nervio motor) y un efector que en este caso es una fibra muscular. En la unión neuromuscular intervienen una neurona presináptica, una o más células musculares y un espacio entre ellas llamado espacio sináptico. Esta unión funcional es posible debido a que el músculo es un tejido eléctricamente excitable.

El mecanismo habitual de transmisión es indirecto, las células neuronales y musculares se hallan aisladas eléctricamente una de la otra. Un cambio en el potencial eléctrico de la célula presináptica desencadena la liberación de moléculas químicas conocidas como transmisores, las cuales se almacenan dentro de vesículas sinápticas y se liberan por medio de exocitosis. El transmisor liberado se une a canales iónicos específicos al transmisor, concentrados en la zona sináptica de la membrana celular muscular. Estos canales iónicos se abren causando una corriente iónica que altera el potencial de membrana de la célula muscular, transfiriendo la señal desde el nervio.

Cuando un impulso eléctrico llega a la terminal nerviosa, se produce una onda de despolarización que inicia la entrada de iones de Ca^{2+} al interior de la terminal y esto a su vez inducen el acercamiento de las vesículas sinápticas a la membrana presináptica. Con la ayuda de un conjunto de proteínas intracelulares especializadas, las vesículas se fusionan con la membrana celular, causando la liberación del transmisor por medio de exocitosis. En el interior de la terminal presináptica, las vesículas están almacenadas en pozas vesiculares y se ha observado que hay una probabilidad muy baja de que una vesícula se fusione con la membrana celular y libere su contenido.

Observaciones recientes de la sinapsis neuromuscular de rana, muestran la existencia de patrones estereotipados de vesículas vecinas entre los distintos pasos previos a la fusión vesicular. Esto es, una vesícula que se ha fusionado y ha liberado su contenido se encuentra al lado de otra que está en proceso de fusión, y ésta a su vez tiene a su lado otra cuya membrana

está en contacto con la membrana celular, y a su lado tiene una vesícula fusionada con la membrana celular en proceso activo de liberación. Esto sugiere que cada vesícula debe pasar por un conjunto de al menos cuatro estados durante el proceso de exocitosis que conduce a la liberación de transmisor.

Con base en estas observaciones experimentales, en esta tesis se propone un modelo cinético de cuatro estados vesiculares. El modelo se estudió mediante la aplicación de un algoritmo numérico estocástico que simula la solución de la ecuación cinética maestra. Con estas simulaciones se reprodujo el comportamiento sináptico de la unión neuromuscular y se espera que estos resultados contribuyan a entender con más detalle los fenómenos subyacentes que ocurren en la exocitosis del transmisor.

En el capítulo 1 se presenta una revisión breve de las bases fisiológicas del comportamiento de la unión neuromuscular, por ejemplo, la actividad basal en ausencia de estimulación, la respuesta evocada por la actividad eléctrica, así como los fenómenos de facilitación y depresión de la sinapsis. También se presentan los hallazgos experimentales recientes que muestran el patrón estereotipado vesicular durante la liberación del transmisor.

En el capítulo 2 se presenta el modelo cinético propuesto para describir la liberación de transmisor. Además, se hace un desarrollo breve del algoritmo estocástico de Gillespie para simular la cinética del modelo propuesto.

En el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos de las simulaciones del modelo cinético. Se explica el procedimiento y los criterios para determinar, a partir de los datos experimentales, los valores de los parámetros del modelo. Asimismo, se comparan los resultados de las simulaciones con los resultados experimentales correspondientes reportados en la literatura.

En el capítulo 4 se presenta la discusión de los resultados así como sus implicaciones en el entendimiento del proceso de exocitosis del transmisor.

Finalmente, en el capítulo 5 se presentan las conclusiones generales de esta tesis.

Capítulo 1

Fisiología de la sinapsis neuromuscular

1.1. Transmisión sináptica química

Las señales neuronales se transmiten de una célula a otra en lugares especializados de contacto conocidos como sinapsis. La célula presináptica está separada de la célula postsináptica por el espacio sináptico. Un impulso nervioso en la célula presináptica desencadena la liberación de sustancias químicas conocidas como transmisores, que se almacenan en las vesículas sinápticas. Las vesículas sinápticas son organelos de aproximadamente 40 nm de diámetro que transportan a los neurotransmisores y que al fusionarse con la membrana celular liberan el neurotransmisor hacia el espacio extracelular. Al proceso de liberación de neurotransmisores u hormonas mediante la fusión de las membranas de la vesícula y de la célula se le denomina *exocitosis*. Una vez liberado, el transmisor difunde rápidamente a través del espacio sináptico y provoca un cambio del potencial eléctrico de la membrana celular postsináptica. Una vez que el transmisor ha sido secretado, se elimina rápidamente ya sea por la acción de enzimas específicas o bien mediante un proceso de recaptación, tanto por la terminal nerviosa que lo ha liberado como por las células gliales vecinas. La eliminación rápida del neurotransmisor asegura una señalización espacio-temporal precisa en la sinapsis, evitando de esta forma que el transmisor afecte a las células vecinas, y al mismo tiempo, “limpia” el espacio sináptico antes de que se produzca nuevamente la exocitosis de la siguiente vesícula [1].

La información detallada que se tiene de la sinapsis en la unión neuromuscular ha ayudado a entender mejor el proceso de transmisión química. El transmisor acetilcolina se sintetiza dentro de la terminación presináptica y se almacena en las vesículas en cantidades bien definidas denominadas “*cuantos*”, desde las cuales se libera como consecuencia de la acción del impulso nervioso. La liberación de los *cuantos* de acetilcolina ocurre cuando las membranas de la vesícula y de la célula se fusionan y forman un poro a través del cual se inicia la descarga del contenido de la vesícula hacia el espacio sináptico. Esto es seguido por la fusión de la vesícula y la liberación completa del transmisor.[2].

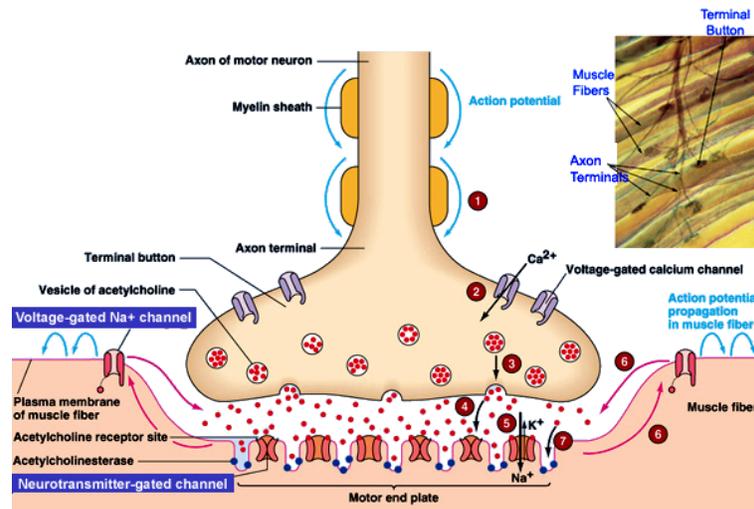


Figura 1.1: Dibujo esquemático de una sinapsis neuromuscular. Imagen tomada de [2]

El proceso mediante el cual un impulso nervioso presináptico estimula la contracción de una célula muscular se resume como sigue:

- El proceso se inicia cuando un impulso nervioso llega a la terminal nerviosa y despolariza la membrana celular plasmática (fig. 1.1-1). Ello da lugar a la apertura transitoria de los canales de Ca^{2+} regulados por el voltaje de la membrana. Debido a que la concentración de Ca^{2+} extracelular es mayor que la concentración de Ca^{2+} libre en el interior de la célula, se produce un flujo de Ca^{2+} que incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} (fig. 1.1-2). El aumento de la concentración de Ca^{2+} en la vecindad de la vesícula, activa la liberación localizada de acetilcolina de las zonas activas presinápticas al espacio sináptico (fig. 1.1-3).
- La acetilcolina liberada se une a receptores específicos situados en la fibra muscular de la membrana plasmática (fig. 1.1-4), abriendo transitoriamente los canales catiónicos que están asociados a estos receptores. Entonces, se genera un influjo de Na^+ que da lugar a la despolarización localizada de la membrana (en una zona llamada *motor end-plate*) y consecuentemente se produce un potencial postsináptico (*end-plate potencial, e.p.p.*) (fig. 1.1-5).
- La despolarización de la membrana plasmática de la fibra muscular abre los canales de Na^+ de la membrana regulados por voltaje, permitiendo la entrada de más Na^+ , lo que la despolariza aún más, formándose así un potencial de acción que viaja a lo largo de la fibra (fig. 1.1-6).

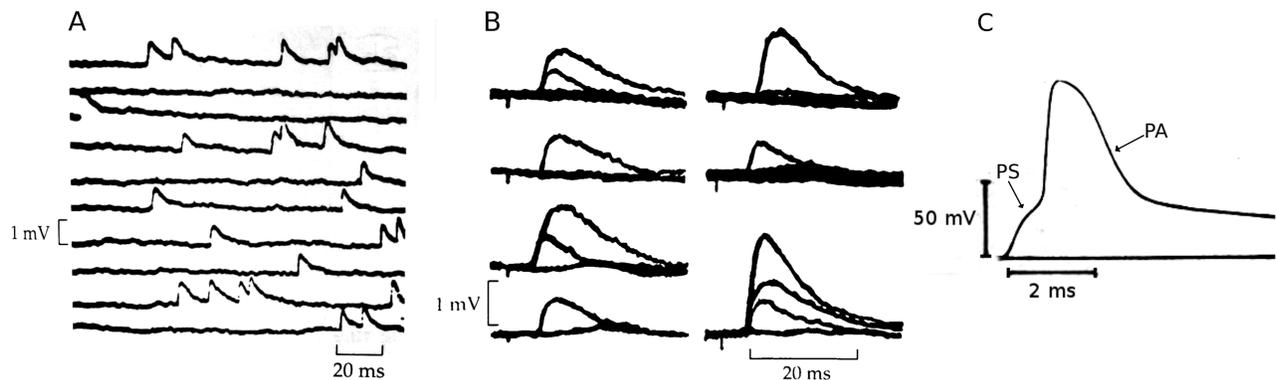


Figura 1.2: A.- Registros de potenciales espontáneos en la placa neuromuscular de rana. B.- Cambios discretos en la amplitud de los potenciales postsinápticos producidos mediante estimulación eléctrica en condiciones de baja concentración de Ca^{2+} extracelular, sugiriendo la naturaleza cuántica de la liberación de transmisor. C.- Registro intracelular del potencial postsináptico (PS) evocado por un estímulo nervioso en condiciones fisiológicas normales, seguido por el potencial de acción (PA) en la fibra muscular. Nótese las diferencias de escalas de tiempo y de voltaje en las tres imágenes. Figuras adaptadas de [3].

- La despolarización generalizada de la membrana plasmática de la fibra muscular provoca la apertura transitoria de canales de liberación de Ca^{2+} de regiones adyacentes de la membrana del retículo sarcoplasmático. Esto provoca la contracción de las miofibrillas de la fibra muscular.
- Una vez realizada su función, la acetilcolina se degrada rápidamente por la acción de la enzima acetilcolinesterasa que la transforma en colina y acetato (fig. 1.1-7).

1.2. Actividad basal espontánea

En 1952, Fatt y Katz descubrieron en la sinapsis neuromuscular la aparición de actividad espontánea basal en forma de potenciales postsinápticos miniatura (*“miniature end-plate potential”*) (ver fig. 1.2A). Excepto por la ocurrencia espontánea y el tamaño pequeño, los potenciales espontáneos son similares a los potenciales postsinápticos evocados por estimulación eléctrica (fig. 1.2C). La actividad espontánea ha sido observada en diferentes tipos de uniones neuromusculares [3, 4] y se ha encontrado actividad similar en sinapsis neuronales en el sistema nervioso central [5].

Las terminales nerviosas motoras están en actividad secretora intermitente (fig. 1.2A), liberando cuantos del transmisor en intervalos de tiempo aleatorios a una razón promedio de un evento por segundo. Dichos eventos producen potenciales miniatura que están por debajo del nivel de umbral de disparo de la fibra muscular, por lo tanto, no producen contracción

[3, 4]. Sin embargo, un impulso nervioso causa que esta actividad se intensifique enormemente en un lapso de tiempo breve, dando lugar a la sincronización de cientos de estos eventos cuánticos en menos de un milisegundo. Así pues, un potencial postsináptico es el resultado de la liberación simultánea de múltiples *cuantos* de transmisor (fig. 1.2B) [1].

1.3. Naturaleza estadística de la liberación cuántica

El número de *cuantos* de transmisor liberados como respuesta a un estímulo puede variar dependiendo de las concentraciones extracelulares de Ca^{2+} y Mg^{2+} . El Ca^{2+} es un cofactor esencial en la liberación del transmisor, mientras que el Mg^{2+} actúa como un inhibidor de este proceso [1]. En condiciones experimentales de baja concentración de Ca^{2+} y alta concentración de Mg^{2+} en la solución salina en la placa neuromuscular, la cantidad de transmisor liberada como consecuencia de un estímulo se reduce a niveles bajos y se hace evidente la naturaleza estadística de la liberación *cuántica* (*quantal release*) (fig. 1.3C). La amplitud de los e.p.p.s muestran fluctuaciones que se pueden predecir con precisión. Estas se presentan con probabilidades que se distribuyen de acuerdo con la distribución Poisson. [6]. Esta distribución de probabilidades predice de N estímulos, cuántos tienen la probabilidad de liberar cero, uno, dos, tres, etc. cuantos de transmisor. Así, si m es el número promedio de cuantos liberado por estímulo, entonces la probabilidad de que un estímulo libere x cuantos de transmisor es:

$$p(x) = \frac{m^x}{x!} e^{-m} \quad (1.1)$$

Para una cantidad N suficientemente grande de observaciones, el valor $Np(x)$ es bastante cercano a lo observado experimentalmente (ver fig. 1.3) [1, 6, 7].

Al considerar que la liberación cuántica del transmisor ocurre de acuerdo con una distribución de Poisson, se están suponiendo tres hipótesis importantes, a saber: 1) el número de cuantos almacenados en la terminal nerviosa es mucho mayor que el número de cuantos liberados; 2) la probabilidad p de que se libere un cuanto es muy pequeña; 3) cada uno de los eventos de liberación cuántica es independiente de los otros. Así, la liberación cuántica del transmisor se realiza en eventos probabilísticos [1].

1.4. Plasticidad sináptica: procesos de facilitación y depresión

La eficacia de la transmisión en una sinapsis puede variar como consecuencia de la actividad previa. Durante estimulación sostenida (tren de estímulos), se observa experimentalmente

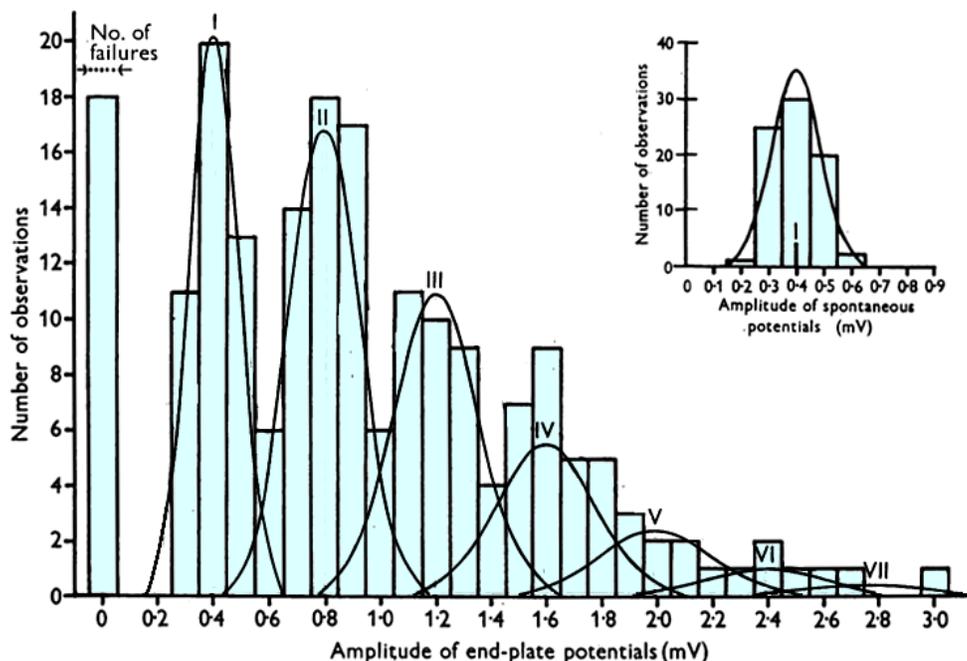


Figura 1.3: Distribución de las amplitudes de 200 potenciales postsinápticos (e.p.p.) registrados en una fibra neuromuscular. Los picos en la distribución ocurren en 1, 2, 3,... veces el valor de la amplitud media de los potenciales miniatura espontáneos (recuadro). Las curvas gaussianas son dibujadas alrededor de los múltiplos enteros de la amplitud promedio de los potenciales espontáneos. El número de e.p.p.'s en cada grupo es calculado suponiendo una distribución de Poisson (ec. 1.1). Las fallas se refiere al hecho de no observar ningún e.p.p. como respuesta al estímulo. Imagen adaptada de [7].

que los potenciales postsinápticos evocados por estimulación presináptica, tienen un aumento consecutivo de su amplitud, esto es, la respuesta de la sinapsis después de un primer estímulo aumenta. En otras palabras, se produce una *facilitación* en la liberación del transmisor, pero que en los siguientes cientos de milisegundos se ve gradualmente reducido. En cambio, después de cierto tiempo, ocurre una disminución progresiva de la amplitud de los potenciales postsinápticos indicando una *depresión* en la liberación del transmisor. Es así que durante un tren de estímulos se observa una *facilitación* inicial de la liberación seguida de una subsiguiente *depresión* (fig 1.4) [8].

Varios estudios sugiere que la *facilitación* durante estimulación está relacionada con el aumento progresivo de Ca^{2+} residual intracelular presináptico remanente de los estímulos previos, lo cual incrementaría la probabilidad de liberación [9]. Por otra parte, la *depresión* observada después de una liberación cuántica relativamente grande sugiere que un factor subyacente es el agotamiento de vesículas con transmisor en la terminal nerviosa [8]. De hecho, experi-

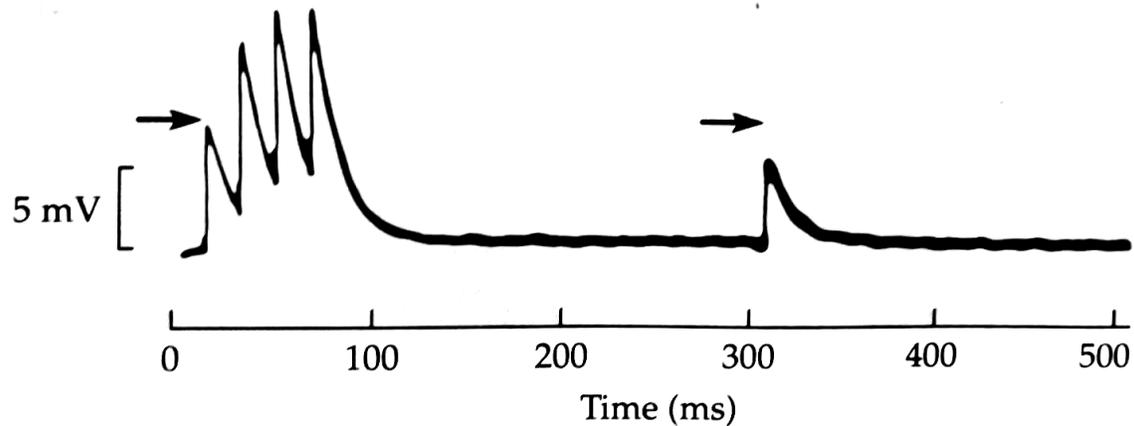


Figura 1.4: Registro de una serie de potenciales postsinápticos mostrando la facilitación y depresión de la liberación de transmisor, en la sinapsis neuromuscular. Imagen tomada de [8]

mentos realizados en placa neuromuscular de rana indican que la depresión es acompañada por una reducción de la probabilidad de liberación [10].

1.5. Mecanismo de exocitosis

La exocitosis de las vesículas sinápticas involucra la acción colectiva de un conjunto de proteínas intracelulares conocidas como SNARE¹ (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*) que enlazan a la membrana vesicular con la plasmática de la terminal nerviosa (ver fig. 1.5). Además, la exocitosis sigue una serie de pasos, a saber: La membrana vesicular contiene cierto tipo de proteínas de la familia SNARE que interaccionan con otras dos proteínas SNARE de la membrana plasmática. El conjunto de proteínas permiten el anclaje de la vesícula a la zona activa, y entonces se dice que la vesícula se localiza en el estado *docking* (fig. 1.5A). El siguiente paso es el estado *priming*, caracterizado por el cambio en la conformación estructural de las proteínas, que obliga a la vesícula a hacer contacto cercano con la membrana plasmática (fig 1.5B). La entrada de Ca^{2+} produce un nuevo cambio conformacional del conjunto de proteínas SNARE, induciendo la fusión de las membranas vesicular y plasmática, lo que conduce a la formación del poro que crece en tamaño y eventualmente produce la fusión vesicular que libera el contenido total de transmisor al espacio sináptico (fig. 1.5C).

¹Para una revisión más general del tema se recomienda consultar [5].

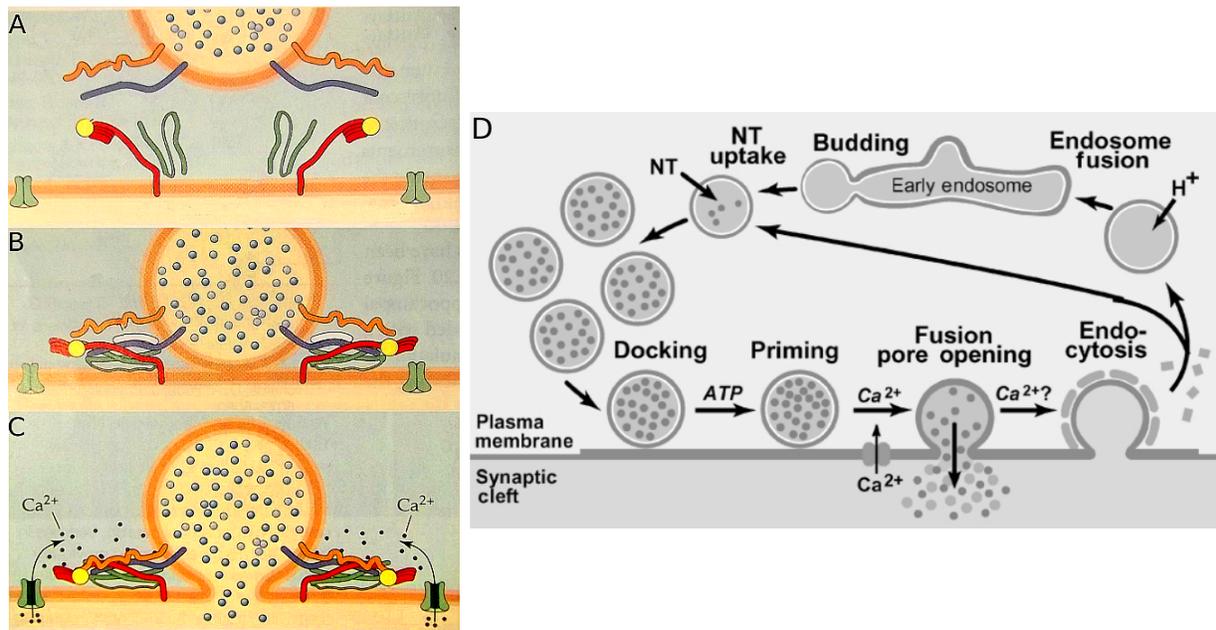


Figura 1.5: Etapas en la fusión vesicular. A.- Estado *docking* de la vesícula. B.- Vesícula en estado *priming*. C.- Fusión de las membranas vesicular y con la plasmática, permitiendo la formación del poro de fusión y la subsiguiente liberación del transmisor al espacio sináptico. D.- Ciclo de exocitosis vesicular. Desde una poza de vesículas libres *undocked*, pasan al estado *docking* anclándose a la membrana celular (A). Eventualmente las vesículas pasan al estado *priming* permitiendo tener contacto cercano con la membrana plasmática (B). Con la entrada de Ca^{2+} , un cambio conformacional de la proteínas induce la formación del poro de fusión, permitiendo la liberación del transmisor (C). Después de liberar su contenido, la vesícula se recicla por medio de endocitosis, la cual eventualmente vuelve a recargarse de transmisor e iniciar el ciclo. Imágenes tomadas de [5] y [11] respectivamente.

1.6. Pozas vesiculares sinápticas

Las vesículas sinápticas son similares entre ellas tanto en estructura, localización subcelular y, presumiblemente, composición molecular. No obstante, durante décadas se ha observado en diversas preparaciones la existencia de heterogeneidad en la probabilidad de liberación de los transmisores [12, 13]. De acuerdo con su participación en la cinética de liberación, las vesículas sinápticas se clasifican en distintos grupos denominados *pozas vesiculares* (vesicle pool) y se han propuesto tres grupos: La *poza de reciclaje* (recycling pool) encargada de mantener la liberación del transmisor durante estimulación fisiológica; la *poza de reserva* (reserve pool) inerte en cuanto a la liberación del neurotransmisor bajo estimulación fisiológica y la *poza de liberación fácil* (readily releasable pool) que participa en la rápida respuesta sináptica bajo estimulación [12].

La *poza de reciclaje* está compuesta por aquellas vesículas sinápticas que mantienen una velocidad de liberación del transmisor constante en condiciones de estimulación fisiológica. Estas vesículas se fusionan con la membrana presináptica, liberan su contenido, son recicladas por endocitosis en la terminal nerviosa, y se recargan nuevamente con transmisor, proceso que ocurre cíclicamente. Generalmente el tamaño de la *poza de reciclaje* es del 5-20% de la población total de vesículas en la sinapsis [12, 13].

En la *poza de liberación fácil* se incluyen las vesículas que tienen una disponibilidad inmediata para la liberación en respuesta a un estímulo. Estas son las vesículas acopladas directamente en la zona activa dentro de la terminal nerviosa y preparadas para la liberación. Dichas vesículas pertenecen funcionalmente a la poza de reciclaje, sin embargo, se localizan en una poza propia debido a que están ancladas en la zona activa (*docking*) adquiriendo una posición privilegiada para la fusión y la consecuente liberación del transmisor (*priming*) [12, 13, 14]. La población de esta poza es la fracción más pequeña de todas las pozas vesiculares, aproximadamente del 1-2% del total de vesículas en la sinapsis. Por lo tanto, la *poza de liberación fácil* se agota cuando se aplica una estimulación de alta frecuencia en cuestión de milisegundos. A menudo, de 10 a 20 estímulos son suficiente para agotar la poza. Así pues, la *poza de liberación fácil* puede considerarse la base del mecanismo de respuesta rápida de la neurona, pero es demasiado pequeña para mantener la liberación durante una estimulación prolongada (donde la *poza de reciclaje* juega un papel primordial) [12, 13].

La *poza de reserva* está compuesta por todas las vesículas sinápticas que no pertenecen funcionalmente a las dos pozas descritas anteriormente, es decir, todas las vesículas que no liberan y se reciclan en condiciones fisiológicas de estimulación. Esta poza es la más grande de las tres pozas clásicas, y representan al menos el 80% del total de vesículas sinápticas. Se ha sugerido que estas vesículas tienen funciones esenciales para la función sináptica, por ejemplo, amortiguar los efectos de un cambio de dinámica en el reciclado de vesículas en la sinapsis, sin embargo, esto es aún tema de estudio [12, 13].

1.7. Hallazgos recientes

Recientemente, F.F. De-Miguel y U.J. McMahan (en preparación) realizaron experimentos en terminales presinápticas de la unión neuromuscular de rana. Aplicaron estímulos eléctricos con trenes continuos de 10 Hz durante la fijación. Las sinapsis las analizaron con tomografía electrónica y observaron diversos arreglos de vesículas sinápticas a lo largo de la zona activa. Estos arreglos vesiculares forman patrones estereotipados entre vesículas vecinas (fig. 1.6), sugiriendo la importancia de cuatro estados vesiculares durante la liberación de transmisor. El primer estado corresponde a la vesícula en proceso de fusión; el segundo estado corresponde a la vesícula adyacente en proceso de hemifusión; el tercer estado corresponde a la vesícula en estado *priming*, mientras que el cuarto estado corresponde a la vesícula en estado

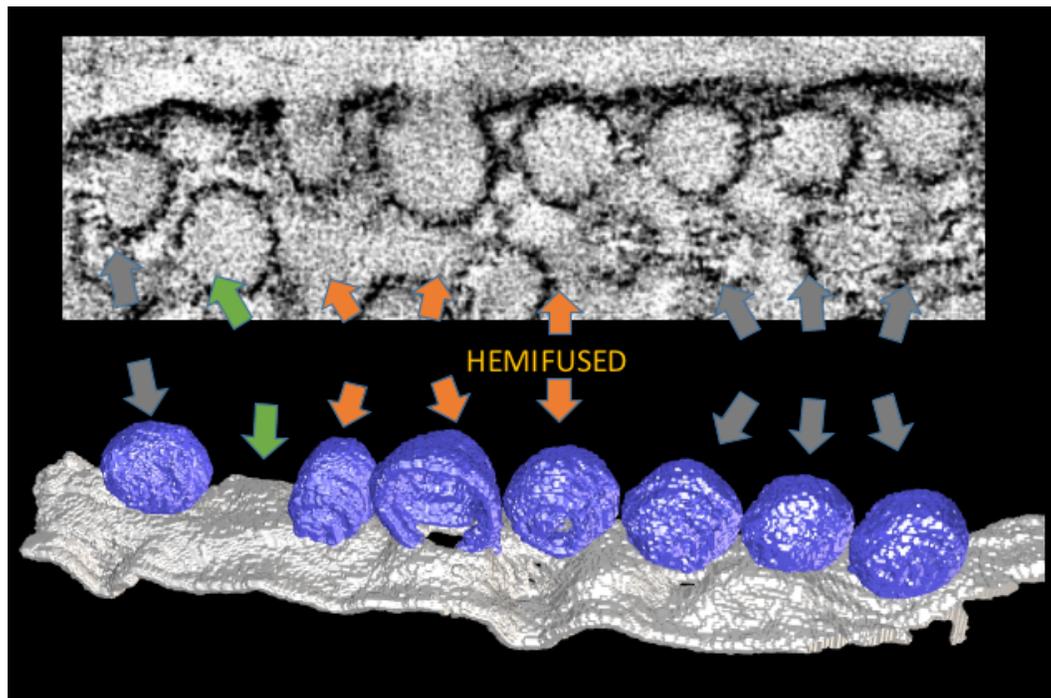


Figura 1.6: Tomografía electrónica y reconstrucción 3-dimensional de la zona activa de la terminal presináptica, después de ser estimulada. Se observan una serie de vesículas vecinas formando un patrón estereotipado entre los distintos pasos vesiculares. Vesículas que se ha fusionado tiene a su lado vesículas que están en hemifusión con la membrana celular, y esta a su vez, tiene a lado vesículas que están en *priming* seguidas de vesículas en *docking*. Imagen proporcionada por F.F.De-Miguel (en preparación).

docking (fig. 1.6). Esto sugiere: 1) la existencia de cuatro etapas o estados durante el proceso de fusión vesicular y 2) cada vesícula pasa por cada uno de estos cuatro estados para que se libere el transmisor.

Con base en estas observaciones, en esta tesis se modela el proceso de liberación de transmisor como una serie de transiciones cinéticas entre los cuatro estados vesiculares. Cada una de las transiciones es promovida por la actividad eléctrica en la sinapsis neuromuscular. En el siguiente capítulo se desarrolla el modelo cinético en detalle.

D cuando la vesícula está completamente fusionada con la membrana celular y ha liberado el transmisor en el espacio sináptico.

Los parámetros $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \beta_1, \beta_2$ representan las constantes cinéticas de reacción que se interpretan como las *velocidades de reacción* de “ida” (α_i) y las de “regreso” (β_i). Como se mencionó en el capítulo 1, después de la liberación del transmisor, las vesículas se reciclan mediante el proceso de endocitosis en la célula presináptica, restableciendo la población vesicular en el interior de la terminal presináptica [15]. Este proceso de reciclado está representado en el modelo cinético mediante la reacción $D \xrightarrow{\gamma} A$ y tiene asociada la constante cinética γ .

Como primera instancia se puede usar la ley de acción de masas para escribir el conjunto de ecuaciones cinéticas clásicas que describen la serie de reacciones definidas por la expresión (2.1), a saber:

$$\begin{aligned} \frac{dA}{dt} &= -\alpha_1 A + \beta_1 B + \gamma D \\ \frac{dB}{dt} &= \alpha_1 A - \beta_1 B - \alpha_2 B + \beta_2 C \\ \frac{dC}{dt} &= \alpha_2 B - \beta_2 C - \alpha_3 C \\ \frac{dD}{dt} &= \alpha_3 C - \gamma D \end{aligned} \tag{2.2}$$

Sin embargo, el uso de estas ecuaciones cinéticas (2.2) excluye la posibilidad de considerar la existencia de gradientes de concentración en las reacciones químicas, que ocurren debido a las fluctuaciones moleculares. En el caso de la cinética de estados vesiculares que se desea describir, el comportamiento colectivo de los elementos que conforman la sinapsis, así como la interacción con su entorno, hacen que el sistema esté fuera de equilibrio termodinámico –como se explicará en el siguiente capítulo–. Como consecuencia de lo anterior, la cinética vesicular está sujeta a fluctuaciones estocásticas equivalentes a las que ocurren en las reacciones químicas debidas a las interacciones moleculares. En particular, se encontró que cuando el número de vesículas fusionadas es mucho menor que el número de vesículas disponibles en la terminal presináptica las ecuaciones cinéticas (2.2) no reproducen los eventos de liberación de neurotransmisores que se observan en los experimentos.

Por lo anterior, la cinética vesicular expresada por (2.1) se describirá mediante una “*ecuación cinética maestra*” –ecuación diferencial parcial en tiempo y espacio– cuya solución determina la evolución espacio-temporal de las probabilidades de transición entre los diferentes estados cinéticos vesiculares. En el caso límite cuando el número de vesículas que liberan neurotransmisor es grande –una fracción considerable del número total de vesículas en la terminal sináptica–, las fluctuaciones inducidas por el comportamiento colectivo de la sinapsis disminuyen significativamente, y es entonces cuando las soluciones obtenidas con las ecuaciones

cinéticas (2.2) reproducen los eventos de liberación de neurotransmisores que se observan en los experimentos [16].

En el contexto de la ecuación cinética maestra, las constantes cinéticas de reacción, $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \beta_1, \beta_2, \gamma$, se interpretan como las probabilidades de reacción por unidad de tiempo. Debido a que la solución de la ecuación cinética maestra es usualmente muy difícil de calcular analíticamente o numéricamente, ésta se aproximará usando el algoritmo de simulación estocástica introducido por Gillespie, para describir la cinética de reacciones químicas [17]. Este algoritmo describe la evolución espacio-temporal del sistema mediante “*caminatas aleatorias*” y transiciones de probabilidad entre los diferentes estados cinéticos.

2.3. Ecuación cinética maestra

En lo que sigue se supondrá que las vesículas puede ocupar alguno de los cuatro estados, $\{A, B, C, D\}$, por lo que se define el *vector de estado* del sistema como:

$$\mathbf{X}(t) = (A(t), B(t), C(t), D(t)) \quad (2.3)$$

donde las funciones $A(t), B(t), C(t), D(t)$ representan el número de vesículas que están en cada uno de los cuatro estados cinéticos vesiculares. De acuerdo con la fisiología, después de cada evento de liberación del neurotransmisor se restablece la población vesicular mediante el proceso de endocitosis. Este restablecimiento está representado en el modelo cinético por la reacción $D \xrightarrow{\gamma} A$. De acuerdo con lo anterior se supondrá que el número total de vesículas, N_0 , contenidas en el volumen V del sistema permanece constante durante la simulación, es decir, $A(t) + B(t) + C(t) + D(t) = N_0$.

En el diagrama de la cinética (2.1) se muestran seis reacciones $\{R_1, \dots, R_6\}$, que corresponden a las transiciones permitidas entre los estados vesiculares. Cada reacción R_j tiene asociadas dos cantidades adicionales:

La primera es el *vector de cambio de estado*:

$$\mathbf{v}_j = (v_{Aj}, v_{Bj}, v_{Cj}, v_{Dj}) \quad (2.4)$$

donde cada v_{ij} corresponde al cambio en el número de vesículas en el estado $i = A, B, C, D$ debido a la reacción R_j . Si el sistema está en el estado $\mathbf{X}(t) = \mathbf{x}$ y ocurre una reacción R_j , el sistema inmediatamente pasará al estado $\mathbf{x} + \mathbf{v}_j$.

La segunda es la *función de propensión* $a_j(\mathbf{x})$ que se define como:

$$a_j(x) dt \stackrel{\text{def}}{=} \text{La probabilidad de que, dado el estado } \mathbf{X}(t) = \mathbf{x}, \text{ una reacción } R_j \text{ ocurra en algún lugar dentro de } V, \text{ en el siguiente intervalo infinitesimal de tiempo } [t, t + dt). \quad (2.5)$$

La definición (2.5) es la premisa fundamental del algoritmo estocástico, ya que a partir de ella se describe la cinética usando teoría de la probabilidad [17]. Si R_j representa la probabilidad de transición de que la vesícula cambie de un estado a otro, es decir,¹ $S_1 \rightarrow S_2$, entonces existe una constante c_j (en este caso es igual a la constante cinética) tal que $c_j dt$ representa la probabilidad de que **una y solamente una** vesícula en el estado S_1 cambie en el siguiente tiempo infinitesimal dt al estado S_2 . De acuerdo con la teoría de probabilidad, si en un momento dado hay x_1 vesículas en el estado S_1 , entonces la probabilidad de que alguna de ellas experimente la transición R_j en el siguiente dt es $x_1 c_j dt$. Por lo tanto, la función de propensión en la ecuación (2.5) tiene la forma sencilla $a_j(x) = x_j c_j$ [17].

Así pues, la ecuación (2.5) nos ayuda a inferir la probabilidad de que ocurra el estado del sistema definido por el vector $\mathbf{X}(t)$, esto es:

$$P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0) \stackrel{\text{def}}{=} \text{Probabilidad de que } \mathbf{X}(t) = \mathbf{x}, \text{ dado } \mathbf{X}(t_0) = \mathbf{x}_0 \quad (2.6)$$

No es difícil derivar una ecuación de evolución temporal para $P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0)$ aplicando la teoría de la probabilidad a la premisa fundamental (2.5). Sin presentar en detalle la deducción de dicha ecuación,² aquí se presentan algunos de los pasos principales a seguir:

De la definición (2.6), la función $P(\mathbf{x}, t + \Delta t | \mathbf{x}_0, t_0)$ es la probabilidad de que el sistema se encuentre en el estado $\mathbf{X}(t + \Delta t) = \mathbf{x}$ en el tiempo $t + \Delta t$, dado que $\mathbf{X}(t_0) = \mathbf{x}_0$. De la definición (2.5), el término $\sum_j a_j(\mathbf{x}) \Delta t$ es la probabilidad de que, dado \mathbf{x} , ocurra alguna de las posibles reacciones R_j en el intervalo de tiempo $[t, t + \Delta t)$. Por lo tanto, su complemento $1 - \sum_j a_j(\mathbf{x}) \Delta t$, es la probabilidad de que, dado el estado del sistema \mathbf{x} , no ocurra ninguna reacción en el intervalo $[t, t + \Delta t)$.

Por otra parte, si $a_j(\mathbf{x} - \mathbf{v}_j) \Delta t$ representa la probabilidad de que el sistema se encuentre en el estado $\mathbf{X}(t) = \mathbf{x} - \mathbf{v}_j$, entonces la reacción R_j ocurrirá en el intervalo de tiempo $[t, t + \Delta t)$. De esta forma, $a_j(\mathbf{x} - \mathbf{v}_j) P(\mathbf{x} - \mathbf{v}_j, t | \mathbf{x}_0, t_0) \Delta t$ es la probabilidad de que el sistema se encuentre en el estado $\mathbf{X}(t) = \mathbf{x} - \mathbf{v}_j$ y que la reacción R_j ocurra en el intervalo de tiempo $[t, t + \Delta t)$. En otras palabras, el término anterior nos dice la probabilidad de que el sistema se localice en el estado $\mathbf{X}(t + \Delta t) = \mathbf{x}$ como consecuencia de que ocurrió la reacción R_j .

¹El algoritmo de simulación estocástica fue implementado originalmente para simular cinéticas de reacciones químicas. En el presente trabajo se adecuó dicho método para simular la cinética vesicular aquí propuesta.

²Una deducción rigurosa de la ecuación maestra se explica con todo detalle en [18].

Así pues, $P(\mathbf{x}, t + \Delta t | \mathbf{x}_0, t_0)$ se escribe en términos de los $M + 1$ posibles caminos que puede seguir el sistema para llegar al estado \mathbf{x} en el intervalo de tiempo $[t, t + \Delta t)$; otra posibilidad es que el estado \mathbf{x} no cambie. De acuerdo con lo anterior se puede escribir la siguiente expresión para la distribución de probabilidad,

$$P(\mathbf{x}, t + \Delta t | \mathbf{x}_0, t_0) = P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0) \left(1 - \sum_{j=1}^6 a_j(\mathbf{x}) \Delta t \right) + \sum_{j=1}^6 a_j(\mathbf{x} - \mathbf{v}_j) P(\mathbf{x} - \mathbf{v}_j, t | \mathbf{x}_0, t_0) \Delta t \quad (2.7)$$

que se puede reescribir como:

$$P(\mathbf{x}, t + \Delta t | \mathbf{x}_0, t_0) - P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0) = - \sum_{j=1}^6 a_j(\mathbf{x}) P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0) \Delta t + \sum_{j=1}^6 a_j(\mathbf{x} - \mathbf{v}_j) P(\mathbf{x} - \mathbf{v}_j, t | \mathbf{x}_0, t_0) \Delta t \quad (2.8)$$

dividiendo esta ecuación por Δt y aplicando el límite cuando $\Delta t \rightarrow 0$, obtenemos la *ecuación maestra* del modelo cinético [18]:

$$\frac{\partial P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0)}{\partial t} = \sum_{j=1}^6 \left(a_j(\mathbf{x} - \mathbf{v}_j) P(\mathbf{x} - \mathbf{v}_j, t | \mathbf{x}_0, t_0) - a_j(\mathbf{x}) P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0) \right) \quad (2.9)$$

La solución de esta ecuación maestra determina completamente la función de probabilidad $P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0)$ que depende explícitamente de la posición y del tiempo así como de la condición inicial. Con ella podemos, en principio, calcular y analizar el comportamiento de los momentos de orden m de cualquier observable del sistema, $h(\mathbf{X}(t))$:

$$\langle (h(\mathbf{X}(t)))^m \rangle = \sum_{\mathbf{x}} (h(\mathbf{x}))^m P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0). \quad (2.10)$$

2.4. Algoritmo de Simulación Estocástica de Gillespie

Una inspección más cercana de la ecuación maestra revela que es realmente un conjunto de ecuaciones diferenciales acopladas, con una ecuación para cada una de las posibles transiciones entre estados cinéticos. Por lo tanto, no es sorprendente que la ecuación se pueda resolver analíticamente sólo para algunas situaciones simples y que en muchos casos sea muy difícil calcular las soluciones numéricas. Debido a lo anterior es necesario buscar otra forma

de resolver el problema sin tener que calcular explícitamente $P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0)$. Para ello se simulan las posibles trayectorias del estado del sistema, $\mathbf{X}(t)$. El elemento clave es generar las trayectorias de $\mathbf{X}(t)$ considerando una función de probabilidad auxiliar $p(\tau, j | \mathbf{x}, t)$, definida como:

$$p(\tau, j | \mathbf{x}, t) d\tau \stackrel{\text{def}}{=} \text{la probabilidad de que, dado } \mathbf{X}(t) = \mathbf{x}, \text{ la siguiente} \\ \text{reacción en el sistema ocurrirá en un intervalo de tiempo} \quad (2.11) \\ \text{infinitesimal } [t + \tau, t + \tau + d\tau) \text{ y será la reacción } R_j.$$

Formalmente, esta función es una densidad de probabilidad conjunta de dos variables aleatorias: el tiempo de la siguiente reacción τ y el índice de la reacción j . No es difícil derivar una expresión exacta para $p(\tau, j | \mathbf{x}, t)$ partiendo de la ecuación fundamental (2.5) y suponiendo que las probabilidades de estas dos variables aleatorias son independientes. Por lo tanto, la función (2.11) se puede factorizar como el producto de dos términos:

$$p(\tau, j) d\tau = p_0(\tau) p(j | \tau) d\tau \quad (2.12)$$

donde $p_0(\tau)$ es la probabilidad de que si el sistema está en el estado $\mathbf{X}(t) = \mathbf{x}$, no ocurra ninguna reacción en el intervalo de tiempo $[t, t + \tau)$; mientras que $p(j | \tau) d\tau$ es la probabilidad de que si no ocurrió ninguna reacción en $[t, t + \tau)$ y $\mathbf{X}(t + \tau) = \mathbf{x}$, la próxima reacción dentro del intervalo $[t + \tau, t + \tau + d\tau)$ será R_j . Esta última probabilidad es justamente la definición de la función de propensión (2.5). Así pues:

$$p(\tau, j) d\tau = p_0(\tau) a_j(\mathbf{x}) d\tau \quad (2.13)$$

Para calcular $p_0(\tau)$, se procede de la siguiente forma: se toma el intervalo $[t, t + \tau)$ y se divide en k subintervalos de tamaño $\delta t = \tau/k$. Ahora, la probabilidad de que no ocurra la reacción R_j en el subintervalo $[t + \delta t)$ es simplemente:

$$1 - a_j(\mathbf{x}) \delta t + o(\delta t^2) \quad (2.14)$$

Así, dado que la probabilidad de ocurrencia o no ocurrencia de las reacciones R_j es independiente entre ellas, la probabilidad total de que en el subintervalo $[t + \delta t)$ no ocurra ninguna reacción, es simplemente la multiplicación de las probabilidades individuales de que no ocurra cada una de ellas, esto es:

$$\prod_{j=1}^6 (1 - a_j(\mathbf{x}) \delta t + o(\delta t^2)) = 1 - \sum_{j=1}^6 a_j(\mathbf{x}) \delta t + o(\delta t^2) \quad (2.15)$$

Esta probabilidad también es válida en el subintervalo de tiempo $[t + \delta t, t + 2\delta t)$ y en los subsecuentes, ya que en cada uno de ellos no ocurre alguna reacción que modifique el estado \mathbf{x} del sistema. Así pues, $p_0(\tau)$ se expresa como el producto de las probabilidades de los k subintervalos:

$$p_0(\tau) = \left[1 - \sum_{j=1}^6 a_j(\mathbf{x})\delta t + o(\delta t^2) \right]^k = \left[1 - \sum_{j=1}^6 \frac{a_j(\mathbf{x})\tau}{k} + o\left(\frac{\tau^2}{k^2}\right) \right]^k \quad (2.16)$$

Aplicando el límite cuando el número de subintervalos es muy grande, $k \rightarrow \infty$ y despreciando términos del orden k^{-2} , se obtiene:

$$p_0(\tau) = \lim_{k \rightarrow \infty} \left[1 - \sum_{j=1}^6 \frac{a_j(\mathbf{x})\tau}{k} \right]^k \quad (2.17)$$

recordando la definición de la función exponencial como un límite de la forma

$$e^x = \lim_{n \rightarrow \infty} \left(1 + \frac{x}{n} \right)^n$$

entonces, la función $p_0(\tau)$ se escribe como:

$$p_0(\tau) = \exp \left[- \sum_{j=1}^6 a_j(\mathbf{x}) \tau \right] \quad (2.18)$$

definiendo

$$a_0(\mathbf{x}) = \sum_{k=1}^6 a_k(\mathbf{x}) \quad (2.19)$$

la forma analítica de la probabilidad (2.11) resulta:

$$p(\tau, j)d\tau = a_j(\mathbf{x}) \exp[-a_0(\mathbf{x})\tau] d\tau \quad (2.20)$$

esta es la ecuación fundamental del Algoritmo de Simulación Estocástica de la cadena cinética (2.1) que se desea modelar.

Lo anterior, nos indica que j es una variable aleatoria entera con valores $j \in \{1, \dots, 6\}$ y con distribución de probabilidad $a_j(\mathbf{x})/a_0(\mathbf{x})$. Además, τ es una variable aleatoria continua con $0 \leq \tau < \infty$ que sigue una distribución de probabilidad exponencial con promedio:

$$\langle \tau \rangle = \frac{1}{a_0(\mathbf{x})}. \quad (2.21)$$

El Algoritmo de Simulación Estocástica consiste esencialmente en generar diferentes trayectorias de $\mathbf{X}(t)$ que sean consistentes con la información que posee la función (2.20), para

después con estas trayectorias equivalentes obtener los promedios de las diferentes poblaciones vesiculares.

Para nuestra cadena cinética 2.1, se tiene en un cierto tiempo t :

- R_1 es $A \xrightarrow{\alpha_1} B$ con $\mathbf{v}_1 = (-1, 1, 0, 0)$; $a_1(\mathbf{x}) = \alpha_1 A(t)$.
- R_2 es $A \xleftarrow{\beta_1} B$ con $\mathbf{v}_2 = (1, -1, 0, 0)$; $a_2(\mathbf{x}) = \beta_1 B(t)$.
- R_3 es $B \xrightarrow{\alpha_2} C$ con $\mathbf{v}_3 = (0, -1, 1, 0)$; $a_3(\mathbf{x}) = \alpha_2 B(t)$.
- R_4 es $B \xleftarrow{\beta_2} C$ con $\mathbf{v}_4 = (0, 1, -1, 0)$; $a_4(\mathbf{x}) = \beta_2 C(t)$.
- R_5 es $C \xrightarrow{\alpha_3} D$ con $\mathbf{v}_5 = (0, 0, -1, 1)$; $a_5(\mathbf{x}) = \alpha_3 C(t)$.
- R_6 es $D \xrightarrow{\gamma} A$ con $\mathbf{v}_6 = (1, 0, 0, -1)$; $a_6(\mathbf{x}) = \gamma D(t)$.

Entonces, utilizando el procedimiento de Monte Carlo estándar se pueden generar muestras de τ y j de acuerdo con sus correspondientes distribuciones de probabilidad. En esta tesis se utiliza el *método de inversión estándar* como sigue: generamos dos números aleatorios r_1 y r_2 a partir de una distribución de probabilidad uniforme en el intervalo $[0,1]$ y se toma:

$$\tau = -\frac{1}{a_0(\mathbf{x})} \ln(r_1) \quad (2.22)$$

$$j = \text{El entero más pequeño que satisface } \sum_{k=1}^j a_k(\mathbf{x}) > r_2 a_0(\mathbf{x}) \quad (2.23)$$

Con este método de generación (o cualquier otro que sea matemáticamente equivalente), tenemos el siguiente Algoritmo de Simulación Estocástica para construir, mediante la simulación numérica exacta, la cinética que sigue el estado del sistema $\mathbf{X}(t)$. Los pasos a seguir son los siguientes:

- 0.- Se inicia el tiempo $t = t_0$ con el estado inicial del sistema $\mathbf{x} = \mathbf{x}_0$.
- 1.- Con el sistema en el estado \mathbf{x} al tiempo t , se evalúan todas las $a_j(\mathbf{x})$ y la suma $a_0(\mathbf{x})$.
- 2.- Se generan valores para τ y j usando las ecuaciones (2.22) y (2.23).
- 3.- Se efectúa la reacción siguiente desplazando el tiempo, $t \rightarrow t + \tau$ y el estado $\mathbf{x} \rightarrow \mathbf{x} + \mathbf{v}_j$.
- 4.- Se registra (\mathbf{x}, t) y se regresa al paso 1 repitiendo nuevamente el ciclo hasta completar la simulación.

Las trayectorias de los estados del sistema $\mathbf{X}(t)$ generadas con el algoritmo se pueden considerar como la versión estocástica de las trayectorias que se obtendrían resolviendo las ecuaciones cinéticas (2.2). Es importante notar que el incremento en el tiempo τ de la simulación estocástica se obtuvo de forma exacta y no como una aproximación finita de algún tiempo infinitesimal dt , como se hace típicamente al resolver numéricamente las ecuaciones cinéticas que forman un sistema acoplado de diferenciales ordinarias. Cuando las trayectorias generadas por el Algoritmo de Simulación Estocástica coinciden con las soluciones de las ecuaciones cinéticas (2.2), entonces se concluye que las fluctuaciones del sistema son muy pequeñas y no afectan en el comportamiento del sistema. Por otra parte, cuando las trayectorias obtenidas con el algoritmo de simulación estocástica se desvían significativamente de las soluciones de las ecuaciones cinéticas (2.2), entonces se concluye que las fluctuaciones del sistema son importantes y no se pueden despreciar. Es decir, las ecuaciones cinéticas deterministas (2.2) no proveen de una descripción precisa del comportamiento del sistema biológico. Este resultado no es sorprendente, se ha demostrado que cuando los sistemas son finitos con “un número relativamente pequeño de moléculas” – en el sistema de interés en esta tesis, “un número relativamente pequeño de vesículas que liberan transmisor” – las fluctuaciones se amplifican y llevan al sistema fuera de equilibrio termodinámico, así pues, juegan un papel importante en el comportamiento del sistema [19].

Dado que el Algoritmo de Simulación Estocástica y la ecuación maestra se derivaron sin realizar aproximación alguna a partir de la premisa fundamental (2.5) entonces son descripciones equivalentes de la cinética del sistema [17]. No obstante, a pesar de que es muy difícil resolver la ecuación maestra, el algoritmo de simulación estocástica es relativamente fácil de implementar, aún siendo comparado con la mayoría de los algoritmos numéricos para resolver las ecuaciones diferenciales cinéticas.

Capítulo 3

Resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la simulación del modelo cinético (2.1) utilizando el algoritmo de simulación estocástica de Gillespie descrito en el capítulo anterior. Para realizar la simulación de la evolución del estado del sistema, $\mathbf{X}(t) = \{A(t), B(t), C(t), D(t)\}$, se escribió un código en lenguaje Fortran 90 para implementar el algoritmo de Gillespie. Se eligió este lenguaje de programación debido a la facilidad de implementación del algoritmo, por la rapidez de ejecución, y porque se tiene un mejor control del código y del algoritmo, comparado con software del tipo Matlab.

Para definir los valores de las constantes cinéticas se consideraron los resultados experimentales reportados en la literatura; estos sugieren que las energías de activación involucradas en las diversas fases del proceso de exocitosis son del mismo orden de magnitud [20, 21]. Por lo anterior, es factible considerar, $\alpha_i = \alpha$ con $i = 1, 2, 3$ y $\beta_j = \beta$ con $j = 1, 2$. Además, se hicieron algunas simulaciones con valores diferentes de las α_i y las β_i y se encontró acumulación de vesículas en los estados cinéticos, lo que va en contra del comportamiento fisiológico observado.¹

Recordamos que la constante cinética de “ida” α está asociada con la transición de una vesícula que pasa a estados más próximos al estado de fusión vesicular que da lugar a la liberación del transmisor químico, mientras que β se interpreta como la constante cinética de “regreso” de una vesícula que pasa a un estado más alejado del estado de fusión. Además, hay que recordar que la constante cinética γ está asociada con el proceso de reciclaje de las vesículas fusionadas. Como se explica en los siguientes párrafos, los valores de estas constantes cinéticas se determinaron considerando datos experimentales obtenidos en la placa neuromuscular de la rana y de un mamífero, reportados en la literatura [3, 7].

Estimaciones experimentales del número de vesículas en la poza de liberación fácil (*readily releasable pool*) en el interior de la sinapsis neuromuscular de la rana es de 10,000 vesículas [12, 13]. De acuerdo con lo anterior, en las simulaciones del modelo cinético se considera una

¹Ver apéndice A.

población vesicular de $N_0 = 10,000$. El análisis de las simulaciones se enfoca en los eventos de la transición $C \xrightarrow{\alpha} D$ que representan la fusión vesicular y la subsecuente liberación de un *cuanto* de transmisor.

Como se mencionó en el capítulo 1, en experimentos con uniones neuromusculares de ranas y mamífero se reporta la presencia de actividad basal espontánea de la sinapsis [3, 7]. En particular, en tejido de mamífero se ha reportado que la frecuencia promedio entre cada potencial espontáneo registrado es de $f = 1.43 \text{ s}^{-1}$. Igualmente, se reporta que el tiempo promedio entre cada potencial espontáneo fue de $t = 1/f = 0.7 \text{ s}$ [4]. Este tiempo está directamente relacionado con el inverso de la constante cinética α de la reacción $C \xrightarrow{\alpha} D$, así pues, $\alpha = 1/0.7 = 1.43 \text{ s}^{-1}$.

Para limitar el número de constantes cinéticas, se define una nueva variable λ como el cociente:

$$\lambda = \frac{\beta}{\alpha} \quad (3.1)$$

Con esta definición, la constante cinética β se expresa como, $\beta = \lambda \alpha$, por lo que el valor de β queda determinado en términos de α al cambiar el valor λ . Por otra parte, a partir de un valor inicial de la constante de reacción, $\gamma = 1.0 \text{ s}^{-1}$, se analizó el efecto que tiene la variación de esta cantidad en la cinética del sistema.

Con estos valores de las constantes cinéticas se definió el estado inicial del sistema, $\mathbf{X}(t = 0) = \mathbf{x}_0$ como el estado estacionario. Este se obtuvo realizando una simulación suficientemente larga a partir del estado $\mathbf{X}(t' = 0) = \{A = 10000, B = 0, C = 0, D = 0\}$. Las pruebas realizadas indicaron que simular el sistema durante cinco minutos es suficiente para alcanzar el estado estacionario.

3.1. Actividad basal espontánea

El primer resultado que el modelo logró reproducir fue la actividad espontánea de los potenciales miniatura en la unión neuromuscular [3, 4]. En la figura 3.1, se muestran los registros de estos potenciales espontáneos miniatura en el tejido de mamífero (A). En la misma figura, en el lado derecho, se muestran los registros de las transiciones unitarias de $C \xrightarrow{\alpha} D$ que llamaremos *cuantos*, obtenidas de las simulaciones. Es importante notar que estos resultados son muy similares a los resultados experimentales. Estos resultados se encontraron al variar los valores de λ en el intervalo $[0, 500]$, obteniendo el mejor resultado cuando $\lambda = 100$.

Con la finalidad de comparar la frecuencia de los *cuantos* obtenidos de las simulaciones estocásticas con la frecuencia experimental de los potenciales miniatura, se cuantificó la actividad *cuántica* simulando intervalos de tiempo de cinco minutos. Con los datos obtenidos

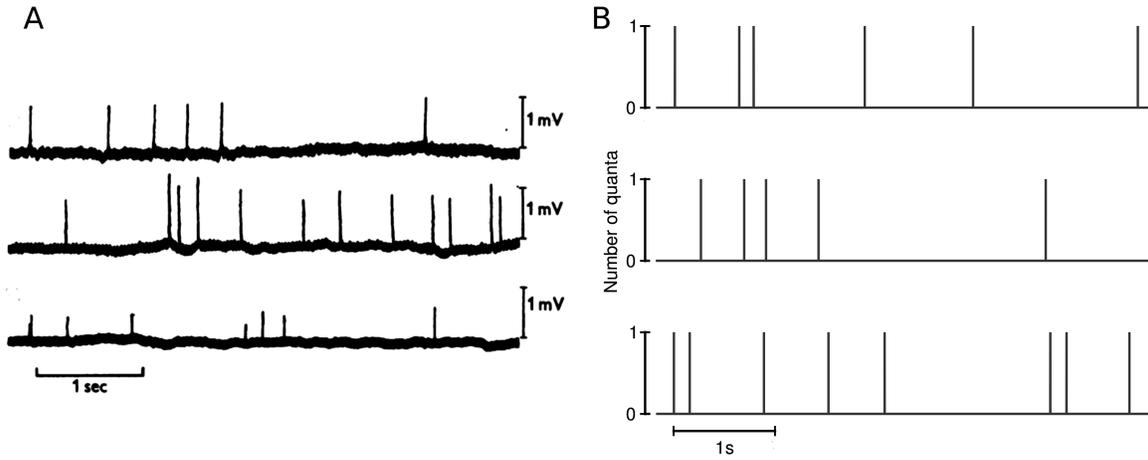


Figura 3.1: Liberación cuántica espontánea. A) Potenciales espontáneos miniatura registrados en terminales neuromusculares de mamífero. Imagen tomada de [4]. B) Registros representativos de la simulación de los eventos de la transición cinética $C \rightarrow D$. Los valores de los parámetros de la simulación fueron estimados a partir de los datos experimentales reportados en [4].

de la simulación, se realizó un análisis estadístico y se encontró que el tiempo promedio entre cada transición espontánea fue de $\langle t \rangle = 0.72 \pm 0.05 \text{ s}$, lo que da una frecuencia promedio de $\langle f \rangle = 1.40 \pm 0.10 \text{ s}^{-1}$. Este valor coincide, dentro del error estadístico, con el valor experimental $\langle f \rangle = 1.43 \pm 0.88 \text{ s}^{-1}$, obtenido en la placa neuromuscular de gato a 37° C [4]. Más aún, en la literatura se reportan intervalos de frecuencias de $(0.5 \text{ s}^{-1} - 5.0 \text{ s}^{-1})$ en tejidos de mamíferos a 37° C ; y $(0.1 \text{ s}^{-1} - 100 \text{ s}^{-1})$ en tejidos de rana a 20° C [3, 4].

Por otra parte, en la literatura también se reporta que experimentalmente la distribución de intervalos de tiempo entre cada potencial espontáneo se distribuye exponencialmente.

En la figura 3.2A, se muestra el histograma reportado de los experimentos realizados en una fibra neuromuscular [4]. De 143 potenciales espontáneos observados, el tiempo promedio entre ellos es de $\langle t \rangle = 1.6 \text{ s}$. Con este dato se estima el valor de $\alpha = 1/\langle t \rangle = 1/1.6 \text{ s}^{-1} = 0.625 \text{ s}^{-1}$ y se toma como dato para las simulaciones estocásticas. Con este nuevo valor de la constante cinética α y considerando $\lambda = 100$, se realizaron simulaciones con duración de cuatro minutos en las que se registró la actividad *cuántica*. Con estos resultados se construyó el histograma que se muestra en la figura 3.2B. Para complementar el análisis se realizó un ajuste de la forma del histograma a la distribución exponencial definida en la ecuación 3.2:

$$n = n_T \Delta t \frac{1}{\langle t \rangle} \exp\left(-\frac{t}{\langle t \rangle}\right) \quad (3.2)$$

en esta ecuación, n_T representa el número total de *cuantos* observados y Δt es el tamaño de

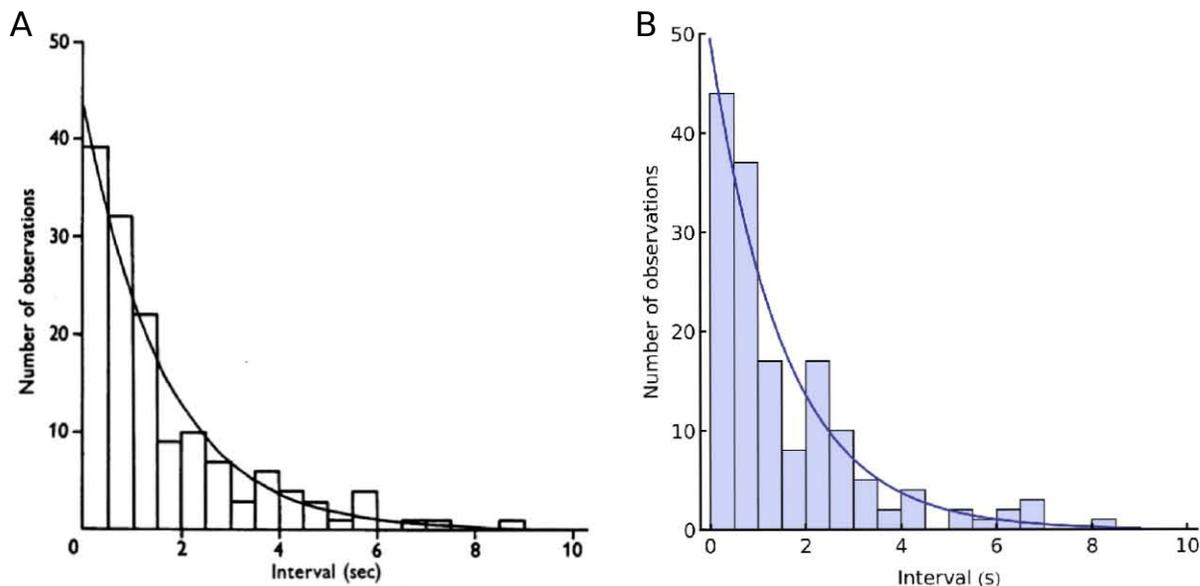


Figura 3.2: A) Distribución del tiempo entre cada potencial espontáneo. En un registro representativo experimental se observaron 143 potenciales miniaturas. El tiempo promedio entre cada potencial fue de 1.6 segundos. Imagen y datos tomados de [4]. B) Distribución del tiempo entre cada evento cuántico, obtenido de las simulaciones estocásticas. En el registro representativo, se observaron 153 eventos con un tiempo promedio entre ellos de 1.54 segundos. En ambos gráficos, la curva representa la predicción teórica de una distribución exponencial (ec. 3.2).

los intervalos en el histograma. De esta forma, se encontró el número esperado de eventos espontáneos, n , entre t y $t + \Delta t$ con $\Delta t = 0.5$ s. En la figura 3.2B se muestra el histograma de un registro representativo obtenido de las simulaciones estocásticas. Se obtuvieron 153 eventos espontáneos con un intervalo promedio de tiempo de $\langle t \rangle = 1.54$ s, y una frecuencia promedio de $1/\langle t \rangle = 0.65 \text{ s}^{-1}$. Estos resultados confirman que el modelo cinético propuesto y analizado con el algoritmo de simulaciones estocásticas de Gillespie, reproduce cuantitativamente el comportamiento de los potenciales espontáneos que se obtienen en experimentos realizados en la unión neuromuscular.

3.2. Naturaleza estadística de la liberación cuántica

Por otra parte, un estímulo en la terminal nerviosa dispara el ingreso de Ca^{2+} extracelular al interior de la célula, lo que a su vez promueve la liberación del transmisor. Es decir, la aplicación de un estímulo aumenta la probabilidad de que una vesícula se mueva a estados más cercanos al estado de fusión [11, 22]. Se observa experimentalmente que cuando la

concentración de Ca^{2+} es baja y la concentración de Mg^{2+} es alta, la cantidad de *cuantos* de neurotransmisor liberados en respuesta a un estímulo se distribuye estadísticamente de acuerdo con la distribución de Poisson [23].

Considerando lo anterior en las simulaciones estocásticas, el ingreso de Ca^{2+} debido a la estimulación se modeló sumando a la constante cinética α una función de estimulación, $f(t)$:

$$\alpha_s = \alpha + f(t) \quad (3.3)$$

de esta manera se tiene una constante cinética efectiva α_s que depende del tiempo a través de la función de estimulación. Se propone esta forma considerando que el estímulo afecta solamente a las reacciones que promueven la fusión de la vesícula con constante cinética α . Así pues, en las simulaciones se introduce la variable α_s , y con ella se calculan las funciones de propensión que son afectadas por el estímulo. Por otra parte, en la literatura se reporta que después de un estímulo, la concentración de Ca^{2+} intracelular de la terminal presináptica disminuye exponencialmente [24]. Tomando en cuenta lo anterior, se eligió a la función de estimulación $f(t)$ como:

$$f(t) = \begin{cases} 0 & \text{si } t < t_e \\ \exp\left(- (t - t_e)/\tau_e\right) & \text{si } t \geq t_e \end{cases} \quad (3.4)$$

donde t_e es el tiempo en que inicia el estímulo, y τ_e es la duración media del estímulo.

De acuerdo con las consideraciones anteriores se realizaron simulaciones estocásticas para calcular la cantidad de vesículas que se fusionan como respuesta a la aplicación del estímulo $f(t)$. Se aplicó un tren de 250 estímulos con un tiempo de separación entre ellos de cinco segundos, esto último se hizo para permitir que el sistema regrese a su estado estacionario después de cada estímulo. El valor de τ_e se varió en el intervalo de tiempo [0.05, 1.50] ms. Los histogramas del número de *cuantos* liberados en la exocitosis se muestran en la figura 3.3. Se compararon las distribuciones obtenidas con la gráfica correspondiente a la distribución Poisson definida por la ecuación (3.5) que se grafica como puntos unidos con líneas sobrepuestos en la figura 3.3.

$$n_x = N_e \frac{m^x}{x!} e^{-m} \quad (3.5)$$

En esta ecuación m es el número promedio de *cuantos* liberados por estímulo, cantidad que se obtuvo de las simulaciones; N_e es el número total de estímulos simulados y n_x es el número de respuestas esperadas que liberaron x *cuantos* (ver tabla 3.1).

En la figura 3.3 se observa que cuando $\tau_e \leq 0.50$ ms, los datos parecen seguir bien una distribución de Poisson, mientras que cuando $\tau_e > 0.50$ ms, los datos se desvían de ella. Para

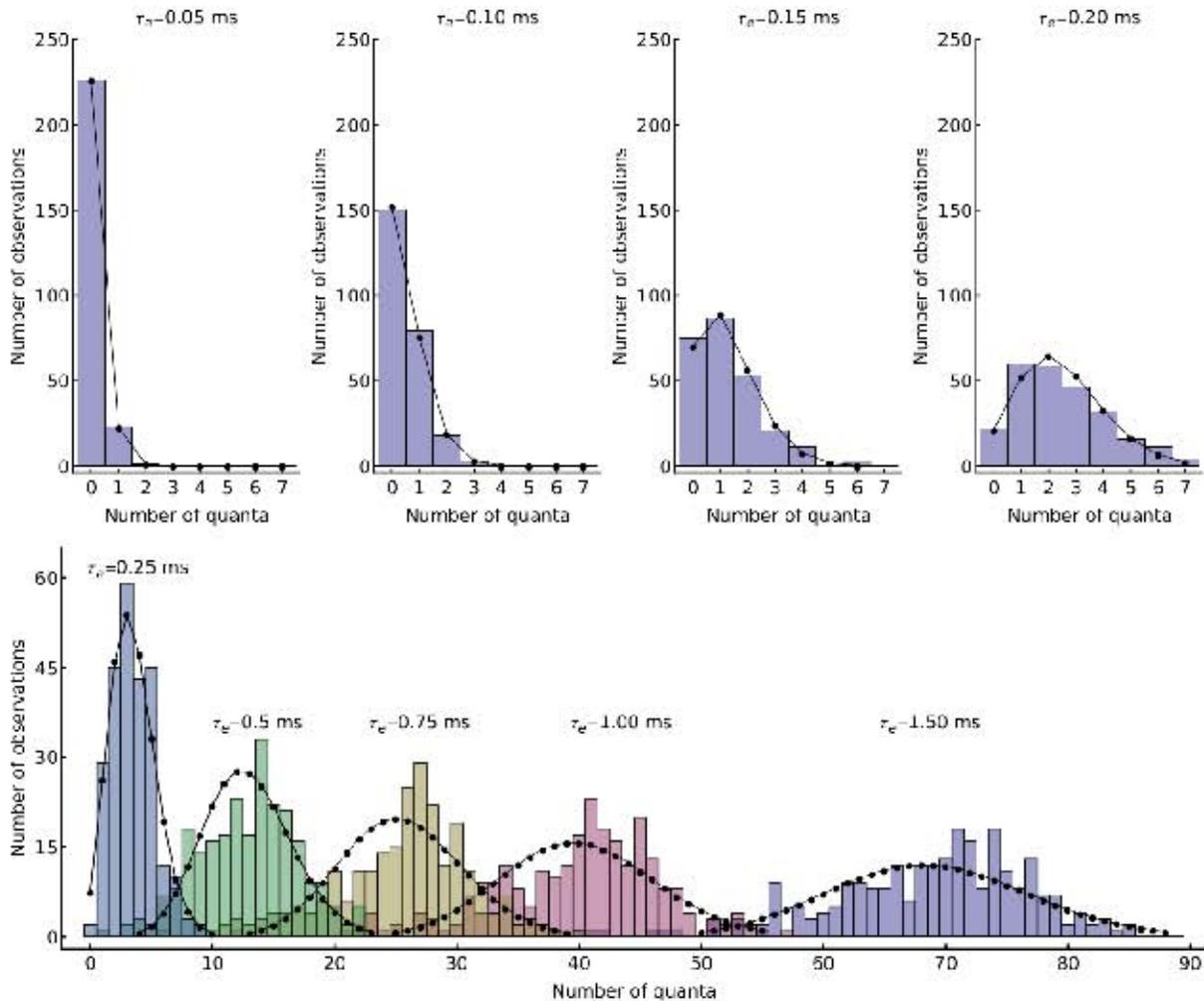


Figura 3.3: Resultado de las simulaciones. Distribución del número de *cuantos* liberados en cada estímulo. Se realizaron un total 250 estímulos. El tiempo medio de duración del estímulo τ_e fue variado en un intervalo de $[0.05, 1.50]$ ms. Los puntos negro representan la predicción teórica suponiendo una distribución de Poisson (ec. 3.5). Se puede observar que a partir de $\tau_e > 0.50$ ms, el número de *cuantos* liberados parece alejarse de la distribución de Poisson. Para discernir este hecho se hizo la prueba estadística, χ^2 de Pearson (ver fig. 3.4).

verificar esta idea, se realizó una prueba estadística χ^2 de Pearson con un nivel de significancia de 0.05, para cada uno de los conjuntos de resultados de la fig.3.3, con las siguientes hipótesis:

H_0 : La distribución del número de *cuantos* liberados por estímulo, sigue una distribución de Poisson.

H_1 : La distribución del número de *cuantos* liberados por estímulo, no sigue una distribución

τ_e [ms]	m
0.05	0.10 ± 0.31
0.10	0.49 ± 0.68
0.15	1.27 ± 1.21
0.20	2.47 ± 1.66
0.25	3.51 ± 1.74
0.50	12.90 ± 4.08
0.75	25.54 ± 5.65
1.00	40.02 ± 6.87
1.50	68.70 ± 8.35

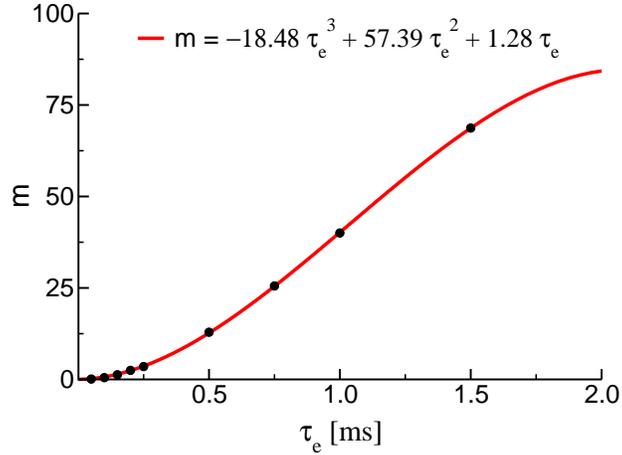


Tabla 3.1: Resultados de la simulación para el número promedio de *cuantos* liberados m por estímulo. Se observa que el parámetro m aumenta conforme se incrementa el tiempo medio de la duración del estímulo. Experimentalmente se reporta un número promedio de *cuantos* liberados dentro del intervalo de (0.38 - 4.0) en condiciones de baja concentración de Ca^{2+} [7]. A la derecha se gráfica el conjunto de datos junto con el mejor ajuste de un polinomio de tercer grado. Esto nos indica que al aumentar la duración del estímulo, hay un incremento no-lineal en la cantidad de *cuantos*, lo que es consistente con el proceso de facilitación. Por otra parte, el grado 3 del polinomio se puede relacionar con el hecho de que la sinaptotagmina requiere al menos tres Ca^{2+} para activar la fusión vesicular [25].

de Poisson.

En la figura 3.4 se muestra el valor de p de la prueba estadística para cada conjunto de datos en función de τ_e . Para valores de $\tau_e > 0.50$ ms, el valor de p es menor que el nivel de significancia de 0.05 (fig.3.4, línea punteada), por lo que la hipótesis nula H_0 se rechaza, en otras palabras, la distribución de los eventos de liberación cuántica no siguen una distribución de Poisson. En cambio, para valores de $\tau_e \leq 0.50$, el valor de p es mayor que el nivel de significancia, lo que indica que los resultados no dan evidencia para rechazar la hipótesis nula H_0 . Esto es consistente con el comportamiento reportado en los datos experimentales de la liberación cuántica en condiciones de concentración baja de Ca^{2+} extracelular y concentración alta de Mg^{2+} , los cuales siguen una distribución de Poisson. En cambio, cuando la concentración de Ca^{2+} es alta y la concentración de Mg^{2+} es baja, la distribución deja de ser de Poisson [5, 23, 26].

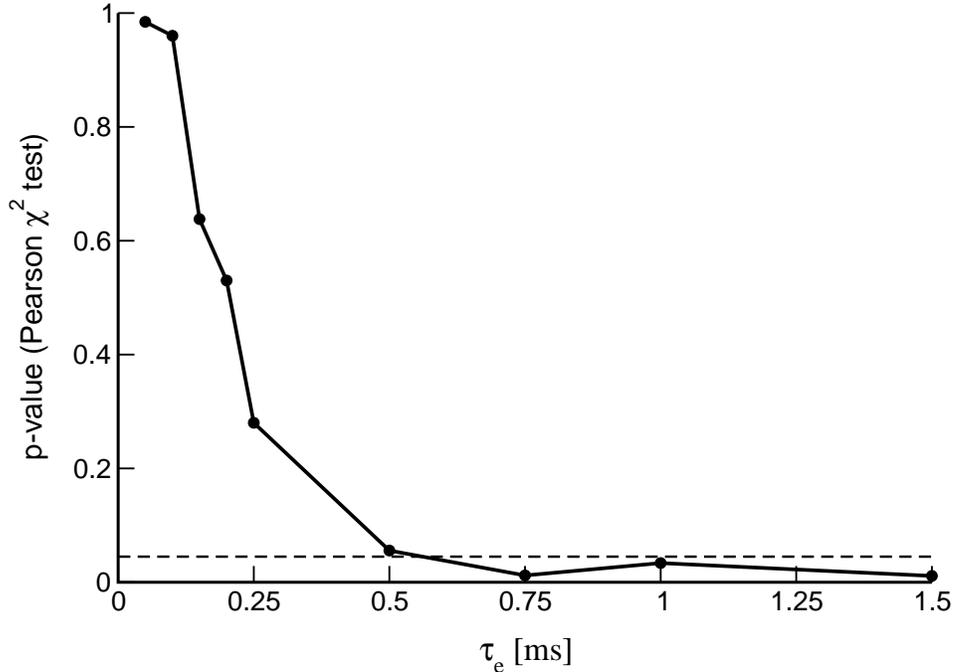


Figura 3.4: Valor del parámetro p de la prueba estadística χ^2 de Pearson realizada a los datos de los histogramas de la fig. 3.3, suponiendo como cierta la hipótesis de que los datos siguen una distribución de Poisson. La línea punteada señala el valor del nivel de significancia de la prueba igual a 0.05. Para valores $\tau_e > 0.50$ ms, el valor de p es menor que el nivel de significancia, por lo que los datos no siguen una distribución de Poisson. Mientras que para valores de $\tau_e \leq 0.50$ ms, es probable que la distribución de eventos “cuánticos” sigan una distribución de Poisson. Esto está acorde con lo reportado en la literatura en sinapsis neuromusculares en condiciones de baja concentración de Ca^{2+} extracelular y alta concentración de Mg^{2+} [5, 23, 26].

3.3. Facilitación y depresión sináptica

Otro resultado interesante que se observa en los experimentos, y que también se obtiene con el modelo cinético propuesto en esta tesis, es el comportamiento de facilitación – depresión en la liberación de neurotransmisor ante una serie de estímulos. Para reproducir este resultado con las simulaciones estocásticas se aplicaron las condiciones experimentales reportadas en los trabajos de Betz [10]. Como recordaremos, estos se realizaron en la placa neuromuscular de la rana en condiciones fisiológicas tales que los niveles de Ca^{2+} y Mg^{2+} son los normales. Además se aplicaron tres estímulos condicionantes previos a un estímulo de prueba [10].

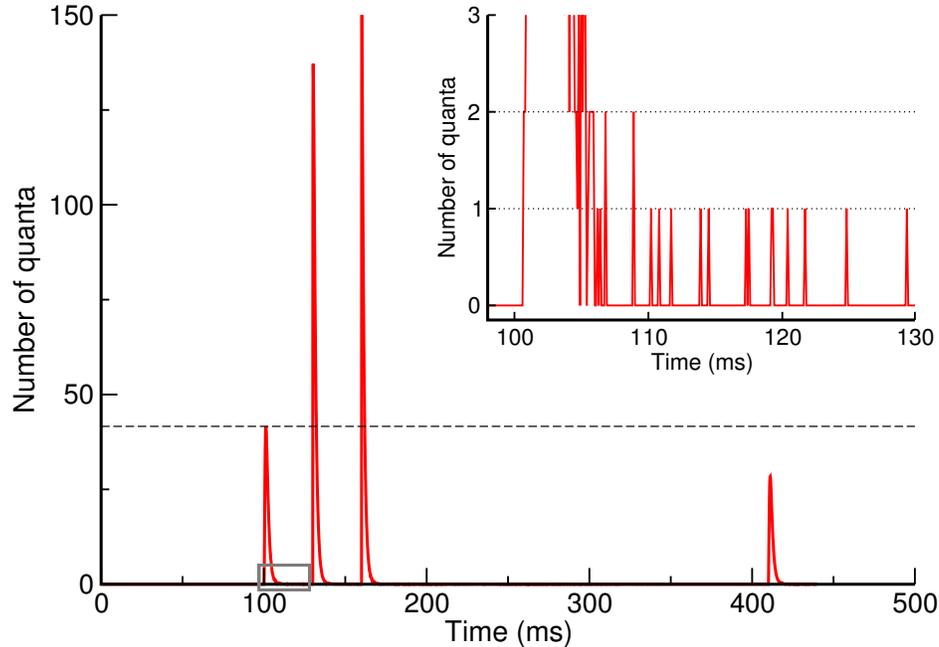


Figura 3.5: Número de cuántos liberados debido a un tren de cuatro estímulos. Se simularon tres estímulos condicionantes con $\tau_e = 1.30$ ms, separados por 30 ms entre sí. Posteriormente, 250 ms después del último estímulo condicionante se dio un estímulo de prueba. Se observan claramente la facilitación en la respuesta al segundo y tercer estímulos y una depresión en la respuesta al estímulo de prueba. Además hubo un aumento en la frecuencia de los eventos cuánticos espontáneos después de cada estímulo (recuadro), comparado con la frecuencia encontrada en ausencia de estimulación previa (véase fig. 3.1).

En la figura 3.5 se muestran las respuestas a tres estímulos condicionantes separados entre sí 30 ms, seguidos de la respuesta a un estímulo de prueba aplicado 250 ms después del último estímulo condicionante. Se observa claramente una facilitación en la respuesta del segundo y tercer estímulos condicionantes con respecto al primero. Sin embargo, existe depresión en la respuesta al estímulo de prueba con respecto al primer estímulo condicionante. Enfocándose en los eventos de liberación de neurotransmisor después de cada estímulo observamos que la frecuencia de la liberación espontánea aumenta considerablemente (fig. 3.5 recuadro) comparada con la frecuencia de liberación espontánea en ausencia de estímulo, como se describió en la primera parte de este capítulo.

En la figura 3.6 se muestran los perfiles de facilitación – depresión normalizados, N_{test}/N_{1cond} ,

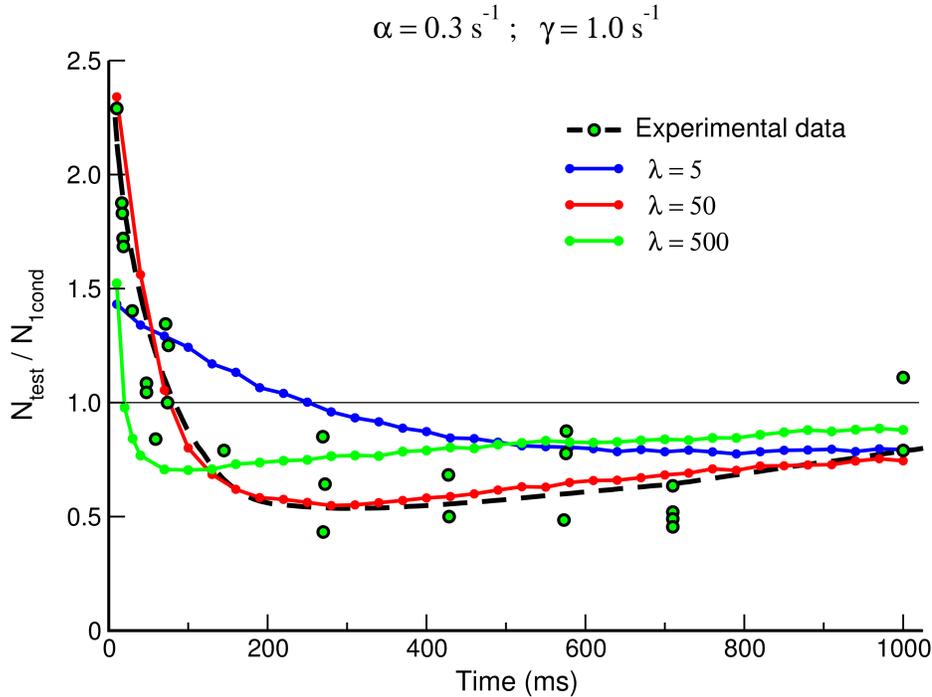


Figura 3.6: Perfiles de facilitación – depresión entre la respuesta del estímulo de prueba N_{test} y el primer condicionante N_{1cond} . En el eje vertical se grafica el número de cuántos normalizado debido al estímulo de prueba. En el eje horizontal se grafica el tiempo entre el último estímulo condicionante y el de prueba. Se observa que para tiempos cortos la facilitación es marcada y eventualmente disminuye para dar lugar a la depresión. Para valores de λ del orden de la unidad (azul), se observa un periodo de facilitación más prolongado y un periodo de depresión nulo. En cambio, si λ aumenta dos ordenes de magnitud (verde), el periodo de facilitación es más corto y se observa una depresión temprana. La línea roja corresponde al mejor ajuste de los datos obtenidos con las simulaciones estocásticas a los datos experimentales reportados en la literatura (círculos negros y línea punteada) [10].

para diferentes valores de λ . Los círculos negros con fondo verde representan los datos experimentales, y las líneas y puntos de diferentes colores representan los resultados de las simulaciones. N_{test} representa el número de *cuantos* liberados debido a la aplicación del estímulo de prueba y N_{1cond} es el número de *cuantos* liberados debido a la aplicación del primer estímulo condicionante. En el eje horizontal se representa el intervalo de tiempo entre el último estímulo condicionante y el estímulo de prueba. Para obtener estos resultados el valor del parámetro α se estimó haciendo un análisis del intervalo de frecuencias de liberación espontánea en experimentos realizados en la placa neuromuscular de rana [3]. Una

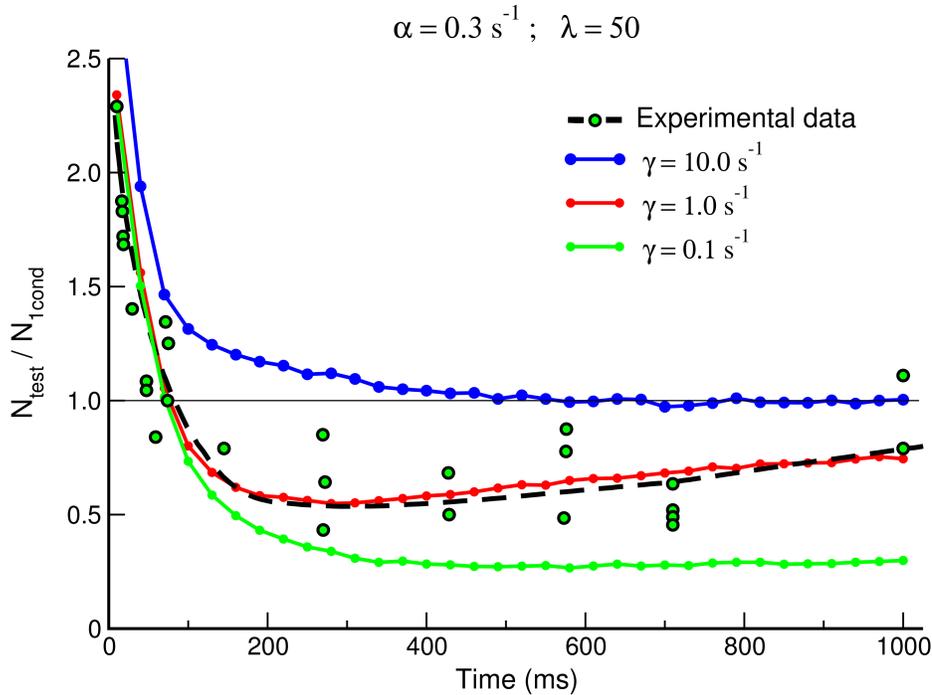


Figura 3.7: Perfiles de facilitación – depresión entre la respuesta al estímulo de prueba N_{test} y el primer condicionante N_{1cond} . Se observa el comportamiento de los perfiles para diferentes valores de la constante cinética γ que esta relacionada con el reciclaje vesicular. Cuando $\gamma = 10 \text{ s}^{-1}$ (azul), se observa un periodo de facilitación sin depresión. En cambio, cuando $\gamma = 0.1 \text{ s}^{-1}$ (verde), el tiempo medio de reciclaje es del orden de $\sim 10 \text{ s}$, y se observa que la depresión aumenta. Los círculos negros y la línea punteada corresponden a los datos experimentales reportados en la literatura [10].

vez estimado el valor de α que condujo a resultados similares a los datos experimentales, se estimó el valor de λ que acercó aún más las simulaciones a los resultados experimentales. Se encontró que los valores de los parámetros que reproducen mejor los perfiles de facilitación y depresión en la sinapsis neuromuscular de rana son: $\alpha = 0.3 \text{ s}^{-1}$ y $\lambda = 50$. Es importante resaltar el hecho de que los valores de α y λ en esta sinapsis son diferentes a los obtenidos en los análisis en las sinapsis de mamífero, descritos en las secciones anteriores. Por otra parte, también se estimó el tiempo medio de estimulación que reproduce mejor los datos experimentales y el resultado fue, $\tau_e = 1.45 \text{ s}$. En la figura 3.6 también se observa que para valores pequeños de λ , del orden a la unidad, existe un periodo de facilitación más prolongado, mientras que para valores de λ mayores en dos ordenes de magnitud, la facilitación disminuye rápidamente y la depresión se presenta a tiempos más cortos.

En la figura 3.7 se muestra la dependencia de la facilitación – depresión en la constante cinética γ . Se observa que cuando $\gamma = 10.0 \text{ s}^{-1}$, hay un periodo mayor de tiempo donde está presente la facilitación, mientras que la depresión prácticamente no se ve expresada. Por otro lado, cuando γ es del orden de $\gamma = 0.1 \text{ s}^{-1}$, después de la facilitación inicial aparece una depresión más pronunciada que se prolonga durante un mayor intervalo de tiempo. Hay que recordar que la constante γ engloba la contribución del reciclaje de las vesículas fusionadas por endocitosis, pero también incluye el *reabastecimiento* de la población de la poza vesicular de liberación fácil por parte de la poza de reciclaje durante la actividad sináptica. La constante γ tiene una importancia relevante ya que mantiene un *suministro* constante para restablecer el número de vesículas inicial en la poza vesicular de liberación fácil.

Capítulo 4

Discusión

En esta tesis se propone y desarrolla un modelo cinético novedoso que explica cuantitativamente, desde un punto de vista molecular, varios aspectos de las observaciones clásicas del proceso de liberación de neurotransmisores en la sinapsis neuromuscular. En este modelo, cada vesícula realiza transiciones cinéticas entre cuatro estados previos a la fusión de las membranas vesicular y celular. El modelo supone que cada una de las transiciones cinéticas que sufre cada vesícula es independiente de las del resto de las vesículas. No obstante, la sinapsis, y en particular, la población total vesicular muestra un comportamiento colectivo como resultado de las interacciones con el citoesqueleto –membrana celular, filamentos, etc.–, las proteínas (motores moleculares), así como los iones de calcio. Se entiende por *fenómeno colectivo* a la manifestación conjunta de las interacciones entre los diferentes elementos o componentes que conforman un sistema y que conducen a una acción concertada en su conjunto.

Debido a que usualmente no se conocen las características específicas de las interacciones que conducen a un fenómeno colectivo, y teniendo en cuenta que el sistema es también perturbado por su entorno, es decir, es un sistema que no está en equilibrio termodinámico, una descripción cuantitativa probabilística o estocástica es lo más natural. Este enfoque estocástico se refuerza si además consideramos que el número de *cuantos* liberados en la exocitosis se distribuye estadísticamente de acuerdo con una distribución de Poisson. De esta forma, las simulaciones estocásticas del modelo cinético reproducen varios aspectos del comportamiento de la sinapsis nerviosa, tales como la actividad espontánea basal de la sinapsis neuromuscular, la actividad debida a la estimulación eléctrica, así como de los procesos de facilitación y depresión.

El hecho que las energías de activación entre estados son similares sugiere que los valores de las constantes cinéticas α_i en las transiciones entre estados cinéticos deben de tener aproximadamente un mismo valor α . Esta constante cinética se estimó realizando un análisis de las frecuencias promedio de los potenciales espontáneos reportados experimentalmente [3, 4, 7]. Considerando una hipótesis análoga para las constantes cinéticas β_i , se estimó el valor de

la constante cinética β que mejor reprodujera el comportamiento de la actividad sináptica espontánea. Se encontró que β debe de ser un orden de magnitud mayor que α para la sinapsis de anfibios y dos ordenes de magnitud mayor que α para la sinapsis de mamíferos. En términos del parámetro $\lambda = \beta/\alpha$, se tiene que $\lambda = 50$ para anfibios y $\lambda = 100$ para mamíferos. Esto sugiere que las interacciones que previenen la fusión vesicular tienen un papel importante en el control de la liberación espontánea del transmisor. Como una prueba adicional que confirme la igualdad de las constantes cinéticas que describen la transición entre cada estado se realizaron simulaciones con valores de α_i y de β_i diferentes. Los resultados obtenidos indican la acumulación excesiva de vesículas en alguno(s) de los estados cinéticos lo que no es consistente con el comportamiento fisiológico.¹

El modelo cinético reproduce muy bien la distribución del número de *cuantos* de transmisor liberados en cada estímulo, en condiciones de baja concentración de Ca^{2+} y alta concentración de Mg^{2+} extracelular. Las distribuciones obtenidas de los experimentos se muestran en la fig. 1.3 mientras que aquellas obtenidas con las simulaciones estocásticas se muestran en la fig. 3.3. Por otra parte, las observaciones experimentales también sugieren que la entrada de Ca^{2+} al interior de la terminal nerviosa en respuesta a la aplicación de un estímulo aumenta la probabilidad de liberación del transmisor [6, 27, 28]. Para considerar la aplicación de este estímulo en el modelo se agregó una función de estimulación, $f(t)$, que decrece exponencialmente después de la aplicación del estímulo, con un tiempo de decaimiento τ_e . –Ver ecuaciones (3.3) y (3.4)–. Esta función de estimulación favorece la transición de las vesículas a estados más cercanos a la fusión vesicular. Así pues, la $f(t)$ se interpreta como la función que modela la entrada de Ca^{2+} al interior de la terminal nerviosa en respuesta a un estímulo eléctrico. Estudios realizados en diversas sinapsis reportan un aumento súbito de la corriente producida por la entrada de Ca^{2+} después de la llegada del estímulo, lo que es seguido de una disminución exponencial de la magnitud de esta corriente [24]. Se encontró también que la cantidad de transmisor liberado está estrechamente relacionada con la cantidad de Ca^{2+} que entra al interior de la terminal presináptica [24].

La función de estimulación propuesta modela la cantidad de Ca^{2+} en el interior de la terminal sináptica variando la duración del estímulo, es decir, variando el tiempo de decaimiento τ_e . De esta forma, se puede modelar el comportamiento de la sinapsis neuromuscular para distintas concentraciones de Ca^{2+} extracelular. Experimentalmente se ha medido el tiempo medio de decrecimiento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de aplicar la estimulación, reportándose en el intervalo de (0.75 ms - 2.0 ms) para concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_o = 10$ mM [24]. Esto sugiere que existe un límite superior para el valor de τ_e en el que la concentración de calcio extracelular es $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Los resultados que se obtienen de las simulaciones indican que para valores de $\tau_e \leq 0.50$ ms, el número de *cuantos* liberados se distribuye estadísticamente de acuerdo con una distribución de Poisson, lo que es consistente con los resultados reportados para sinapsis neuromusculares con bajas concentraciones de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o \approx 0.25$ mM) y altas

¹Ver apéndice A.

concentraciones de Mg^{2+} ($[Mg^{2+}]_o \approx 4$ mM) [7, 6, 23]. Mientras que cuando $\tau_e > 0.50$ ms, el número de *cuantos* liberados deja de distribuirse estadísticamente de acuerdo con una distribución de Poisson. Desde el punto de vista fisiológico estos resultados podrían relacionarse con los distintos comportamientos de la sinaptotagmina –proteína intracelular que funciona como sensor de Ca^{2+} y disparan la fusión vesicular– así como con la familia de las proteínas SNARE y la cantidad de Ca^{2+} intracelular [25].

El modelo cinético se analizó con valores de la constante cinética α estimados a partir de datos experimentales reportados para las sinapsis neuromusculares de rana (sangre fría) y de mamífero (sangre caliente) [3, 4, 7, 8, 10]. Para reproducir los resultados experimentales con las simulaciones se requirió $\lambda = 50$ para la sinapsis de rana y $\lambda = 100$ para la sinapsis de mamífero. Esto sugiere que la temperatura fisiológica juega un papel importante.

Los resultados de las simulaciones reproduce muy bien la distribución de Poisson de los números de *cuantos* liberados que se observa experimentalmente en la sinapsis neuromuscular, lo que refuerza la robustez del modelo. Se obtuvo una distribución de Poisson debido a que el funcionamiento correcto de la sinapsis ocurre en el caso límite $\beta \gg \alpha$. Desde el punto de vista fisiológico esto significa que el número de vesículas por unidad de tiempo que regresan a estados previos a la fusión es mucho mayor comparada con el número de vesículas que sí se fusionan. Así pues, la probabilidad de que una vesícula de la población total se fusione es muy baja.

Por otra parte, cuando se considera, $\alpha = \beta$, es decir, el número de vesículas que se acercan al estado de fusión por unidad de tiempo es igual al número de vesículas que se regresan a estados previos, la distribución estadística del número de *cuantos* liberados por estímulo deja de distribuirse de acuerdo con una distribución de Poisson. En tal caso, la distribución que se obtiene es muy dispersa y no uniforme en el intervalo (0, 150). Análogamente, cuando $\alpha > \beta$, que significa que un mayor número de vesículas por unidad de tiempo se mueven al estado de fusión, el número de cuantos liberados por estímulo no se distribuye de acuerdo con una distribución de Poisson. En estas condiciones la respuesta fisiológica de la sinapsis ante un tren de estímulos conduciría a una depresión temprana sin que hubiera una facilitación previa. Es decir, los mecanismos de prevención de liberación del transmisor serían despreciables por lo que el transmisor contenido en las vesículas se liberaría sin control en la terminal nerviosa.²

El modelo cinético también reproduce los fenómenos de facilitación y depresión que se observan en la sinapsis neuromuscular. La respuesta de un primer estímulo facilita la respuesta del siguiente estímulo, lo que se manifiesta como un incremento no lineal en el número de cuantos liberados. No obstante, después de varias centenas de milisegundos, la depresión predomina en la sinapsis; por ejemplo, si el segundo estímulo se aplica después de 200 ó 300 ms de la aplicación del primer estímulo, la liberación de neurotransmisor es menor de lo que

²Ver apéndice A.

fue al inicio de la estimulación.

La depresión se ha relacionado con el agotamiento en la reserva de vesículas dentro de la terminal nerviosa. No obstante, el análisis del modelo cinético sugiere lo contrario, es decir, por un lado la facilitación indica que aún existe una gran cantidad de vesículas disponibles para ser liberadas, y por el otro, el fenómeno de depresión es debido a la contribución de la constante cinética de regreso β mayor que la constante cinética de salida α . Como se indicó en párrafos anteriores, la actividad eléctrica favorece que las vesículas se muevan hacia estados cinéticos más próximos a la fusión, pero debido a que la constante de regreso β es más grande que la constante de salida α (en este caso, 50 veces mayor), las vesículas regresan a los estados en los que se encontraban previos a la estimulación. Este mecanismo cinético previene la liberación arbitraria del transmisor.

Las neuronas tienen la capacidad de modificar su estructura y su actividad, propiedad que se conoce como plasticidad sináptica. La plasticidad sináptica es una respuesta adaptativa de la neurona a señales externas específicas, a menudo relacionada con la conjunción de dos estímulos separados en tiempo y espacio. La integración de estímulos separados dentro de un intervalo de tiempo corto se denomina detección de coincidencias (*coincidence detection*). Dicha detección de coincidencia toma importancia especial en los mecanismos de procesamiento de información, aprendizaje y memoria [29].

Así pues, el modelo cinético revela que la sinapsis neuromuscular funciona como un detector de coincidencias en el que la respuesta sináptica, después de una estimulación previa, depende del momento en que se realice la medición. Es decir, la aplicación de un estímulo promueve que la población vesicular, inicialmente distribuida en los diferentes estados vesiculares, se mueva un paso hacia adelante más cercano al estado de fusión. Esto es, las vesículas que estaban en el estado A pasan al estado B, y las que estaban en el estado B pasan al estado C, mientras que las pocas que estaban en el estado C pasan al estado de fusión D. La respuesta de la sinapsis dependerá del instante en que llegue el siguiente estímulo, si el estímulo arriba en los siguientes milisegundos, la población vesicular se moverá un paso adicional hacia adelante, promoviendo que una mayor cantidad de vesículas pasen al estado de fusión. En cambio, si el segundo estímulo no llega dentro de un intervalo de tiempo corto, toda la población vesicular que no se haya liberado regresará a los estados más alejados de fusión (ver figura 4.1).

Es importante notar que cuando las constantes cinéticas, α_1 , α_2 y α_3 son diferentes entre sí, así como cuando las constantes cinéticas, β_1 y β_2 son también diferentes entre sí, el modelo cinético no reproduce el comportamiento de la sinapsis. Es decir, la frecuencia de la actividad basal espontánea, la distribución de Poisson del número de cuantos liberados por estímulo, y el fenómeno de facilitación - depresión no se obtienen. El hecho de que las constantes cinéticas de ida por un lado, y las constantes cinéticas de regreso por otro, sean iguales entre sí sugiere que la población vesicular entre los cuatro estados se mueve en conjunto de forma colectiva con la misma tasa de transición cuando se aplica un estímulo. De esta forma la

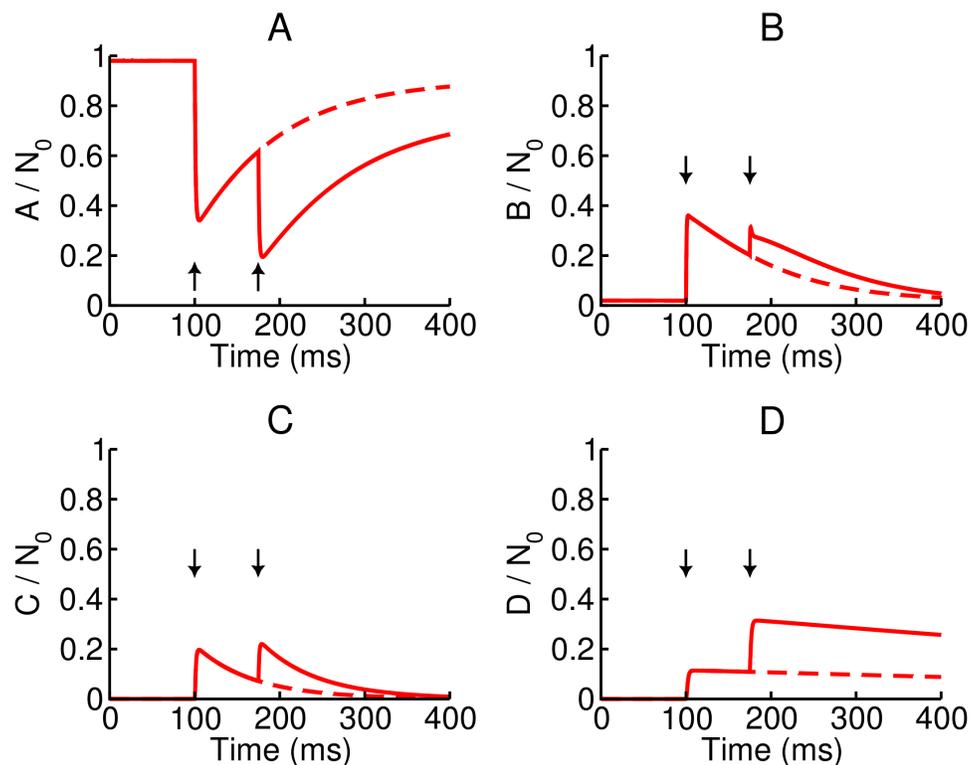


Figura 4.1: Proporción de la población vesicular total en cada uno de los estados cinéticos como función del tiempo. En los primeros 100 ms, la sinapsis se encuentra en su estado basal. Al arribar del primer estímulo (flecha), la población vesicular en el estado **A** disminuye considerablemente Fig. 4.1(A), y se distribuye en los estados cinéticos **B** y **C**. Figs. 4.1(B)-(C). Sólo una pequeña proporción de neurotransmisor se libera en el estado cinético **D**. Después del estímulo, la población vesicular tiende a regresar a su estado basal. La respuesta de la sinapsis dependerá del momento en que llegue el siguiente estímulo. En caso de que no arribe un nuevo estímulo, la población vesicular en cada estado regresará al estado **A** (línea punteada). Sin embargo, si un segundo estímulo llega en los siguientes milisegundos después del primero, la población vesicular que no ha liberado avanzará, promoviendo que una mayor fracción de vesículas pasen al estado de fusión **D** (facilitación). Fig. 4.1(D). De esta forma, la sinapsis neuromuscular funciona como un detector de coincidencias ante dos o más estímulos.

sinapsis evita una acumulación “anormal” de vesículas en algún estado cinético intermedio. Todo esto permite que la sinapsis neuromuscular sea muy predecible en términos fisiológicos.

De acuerdo con todo lo anterior, se puede afirmar que la sinapsis química es una respuesta coordinada debida a la acción colectiva de interacciones entre diferentes elementos como son: los microfilamentos del citoesqueleto, los microtubulos, los filamentos entre las vesículas, las fluctuaciones de la membrana celular, los canales iónicos, los iones de calcio y los motores moleculares (proteínas intracelulares) involucrados en el proceso de fusión vesicu-

lar. Específicamente, las interacciones moleculares debidas al conjunto de macromoléculas conocidas como AZM (*Active Zone Material*) se han estudiado en diversas sinapsis neuromusculares [5, 22, 30]. El conjunto AZM es un arreglo de macromoléculas altamente organizado que conecta a las vesículas sinápticas con la membrana celular en la zona activa; además de estar directamente involucradas en todas las fases de la exocitosis vesicular [22]. La familia de proteínas intracelulares SNARE, la sinaptotagmina y los canales de Ca^{2+} forman parte del conjunto AMZ, pero no son las únicas. La identificación y la naturaleza bioquímica de los componentes del complejo AZM siguen siendo tema de estudio [5, 22].

Para finalizar este capítulo es importante enfatizar que el modelo cinético propuesto considera de forma general las interacciones de las macromoléculas a través de las constantes cinéticas α y β . Se estimó que las constantes cinéticas de las interacciones moleculares que provienen de la fusión vesicular son al menos 50 veces mayores que las constantes cinéticas de las interacciones moleculares que las promueven. Por otra parte, diversos estudios en sinapsis neuromusculares de ratones y ranas han encontrado diferencias significativas en el tamaño y distribución relativas de sus correspondientes conjuntos de macromoléculas AZM [30]. Esto puede dar una pauta para entender, en parte, el valor diferente de λ para las sinapsis de mamífero y anfibio.

Capítulo 5

Conclusiones

En esta tesis se propuso y estudió un modelo cinético novedoso que explica cuantitativamente las observaciones clásicas del proceso de la exocitosis de neurotransmisores en la sinapsis neuromuscular. Se demostró que la liberación del transmisor está regulada por una sucesión de transiciones entre cuatro estados cinéticos vesiculares. Las transiciones hacia la fusión vesicular son inducidas por la actividad eléctrica de la sinapsis. La ausencia de actividad eléctrica favorece que las transiciones ocurran en sentido contrario, lo que disminuye significativamente la probabilidad de liberación del transmisor.

Debido a que las fluctuaciones del sistema son significativas cuando el número de vesículas que libera neurotransmisor es pequeño comparado con el número total de vesículas, no es posible hacer una descripción cuantitativa determinista de la exocitosis. Además, considerando que la cinética del proceso de exocitosis de neurotransmisores es el resultado de un conjunto de interacciones complejas entre los diversos elementos de la sinapsis, resulta natural una descripción probabilística o estocástica de este proceso.

El modelo cinético propuesto y analizado con un enfoque estocástico reproduce la actividad basal espontánea de la sinapsis observada en la placa neuromuscular así como la respuesta a la estimulación eléctrica y su plasticidad. Se demostró que la estimulación eléctrica sostenida aumenta la población vesicular en el estado cinético previo a la fusión vesicular. Sin embargo, cuando el intervalo de tiempo entre estímulos aumenta, las constantes cinéticas relacionadas con el regreso de las vesículas a su estado anterior cobran relevancia y promueven que las vesículas se muevan a estados más alejados al estado de fusión vesicular.

Los resultados de las simulaciones predicen, usando valores apropiados de las constantes cinéticas, el comportamiento de la sinapsis neuromuscular, tanto de mamífero como de anfibio. Para obtener estos resultados ha sido necesario considerar que las constantes cinéticas de regreso β sean mucho mayores que las constantes cinéticas, α , –al menos cincuenta veces–. Esto sugiere que las fuerzas que previenen la liberación de transmisor son mayores que aquéllas que la promueven; de esta forma, la sinapsis controla la cantidad de transmisor para

que no se libere más de lo necesario para su funcionamiento correcto. Otra consecuencia de esta gran diferencia entre α y β es que la distribución estadística del número de cuantos liberados se distribuye de acuerdo con una distribución de Poisson.

El hecho de que las constantes cinéticas α_i sean iguales entre sí y las constantes cinéticas β_i sean también iguales entre sí, sugiere que la población vesicular distribuida en los cuatro estados opera como consecuencia de la acción colectiva de las diferentes interacciones moleculares y del citoesqueleto que participan en el proceso de exocitosis. Desconocemos la naturaleza detallada de estas interacciones, pero a pesar de esto, el comportamiento de la sinapsis es muy predecible en términos de su fisiología.

El análisis del modelo cinético propuesto y analizado en esta tesis sugiere que éste es lo suficientemente robusto para predecir cuantitativamente el comportamiento de la sinapsis química neuromuscular.

Apéndice A

Otros Resultados

En este apéndice se presentan los resultados que se obtienen con el modelo cinético (2.1) cuando se consideran diferentes escenarios para los valores de las constantes cinéticas α_i y β_i .

Es importante recordar que experimentalmente se observa que cuando se estimula la sinapsis neuromuscular el número de *cuantos* liberados se distribuye estadísticamente siguiendo una distribución de Poisson. Para reproducir tal distribución, los valores de las constantes cinéticas α_i y β_i se deben elegir apropiadamente.

En la figura A.1 se muestran los histogramas de frecuencias del número de *cuantos* liberados por estímulo obtenidos con las simulaciones en dos casos: (1) cuando las constantes de ida son más grandes que las de regreso $\alpha > \beta$ (Fig. A.1-A); y (2) cuando todas las constantes cinéticas, tanto las de ida como las de regreso, son iguales $\alpha = \beta$, esto es, cuando $\lambda = 1.0$ (Fig. A.1-B). Por otra parte, en la figura A.2 se muestran los perfiles de facilitación - depresión de la sinapsis en estos mismos dos casos. Se observa en dichas figuras que el número de *cuantos* no sigue una distribución estadística de Poisson ni tampoco se reproduce el comportamiento fisiológico de la plasticidad sináptica (fig. A.2). Esto sugiere que la condición de que $\alpha \geq \beta$ no corresponde a una situación fisiológica normal de la sinapsis.

Por otra parte, se analiza también el caso cuando las constantes cinéticas α_i y las constantes cinéticas β_i son diferentes entre si, respectivamente. Para simplificar el análisis, se define λ_1 y λ_2 de la siguiente forma:

$$\lambda_1 = \frac{\beta_1}{\alpha_1} \quad \text{y} \quad \lambda_2 = \frac{\beta_2}{\alpha_2} \quad (\text{A.1})$$

donde λ_1 corresponde a la razón entre las constantes cinéticas de las transiciones $A \xrightleftharpoons[\beta_1]{\alpha_1} B$, mientras que λ_2 corresponde a la razón entre las constantes en las transiciones $B \xrightleftharpoons[\beta_2]{\alpha_2} C$. De esta forma, se analiza la diferencia entre las razones de las constantes cinéticas de distintas

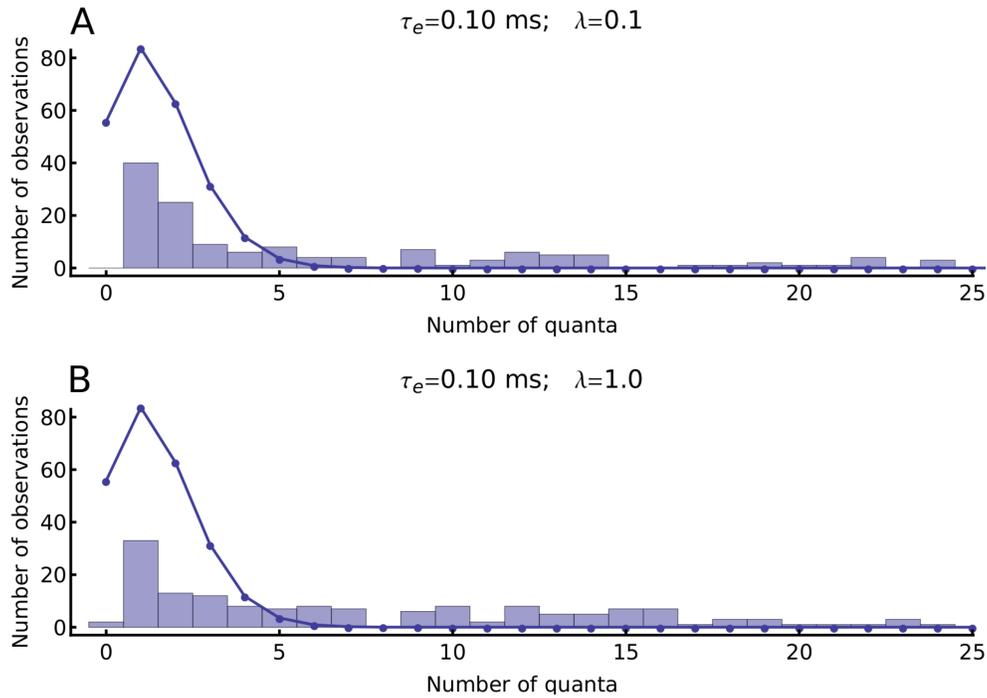


Figura A.1: Distribución del número de cuantos liberados por estímulo. Se realizaron 250 estímulos, con un tiempo medio de estimulación de $\tau_e = 0.10$ ms. (A) Resultado de la simulación cuando $\alpha > \beta$ en un orden de magnitud, esto es, $\lambda = 0.1$. El número de cuantos se distribuye de manera no uniforme en un amplio intervalo de 0 – 120 *cuantos*. El número de *cuantos* promedio liberados es ≈ 40 . (B) Resultados de la simulación en el caso $\alpha = \beta$, esto es $\lambda = 1.0$. En este caso, los datos también se distribuyen de forma no uniforme en el intervalo de 0 – 100 *cuantos*, con un promedio de ≈ 25 *cuantos* liberados. En ambas gráficas, se dibuja con líneas la distribución de Poisson con una media de $\mu = 1.5$, que correspondería a 1.5 *cuantos* liberados

fases del modelo cinético. El valor de la constante cinética α_3 se mantuvo fija asignándole el valor obtenido a partir de las estimaciones de la frecuencia de la actividad basal espontánea de la sinapsis, tal como se explica en capítulo 3.

En la figura A.3 se presentan los resultados del número de *cuantos* liberados por estímulo. Para tener un criterio de decisión y discernir si los datos siguen o no una distribución de Poisson, se realizó una prueba estadística χ^2 de Pearson, con nivel de significancia de 0.05. Con este criterio se encontró que, cuando $\lambda_1 = 5$, la distribución estadística del número de cuantos liberados no se distribuye siguiendo una distribución de Poisson, independientemente del valor de λ_2 . Sin embargo, cuando $\lambda_1 \geq 50$, todos los datos se distribuyen estadísticamente de acuerdo con una distribución de Poisson. Estos resultados sugieren que las interacciones que previenen la transición vesicular al estado de fusión tienen una mayor relevancia en el primer paso de la cinética, comparada con la de los pasos posteriores. Si esto es cierto, tam-

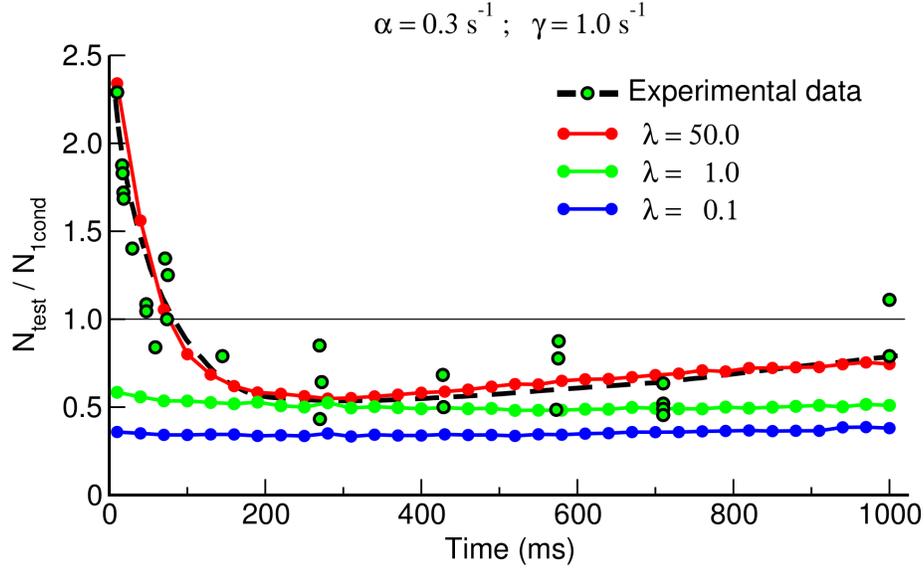


Figura A.2: Perfiles de facilitación - depresión de la sinapsis neuromuscular obtenidos con simulaciones cuando $\alpha = \beta$ (línea verde) y cuando $\alpha > \beta$ (línea azul). Se siguió el mismo protocolo de estimulación descrito en el capítulo 3. Se comparan estos resultados con los obtenidos con la condición de $\beta > \alpha$ (línea roja) y los datos experimentales reportados en [10]. Se observa que en los dos casos de estudio, no ocurre una etapa de facilitación previa y la depresión es muy marcada.

bién deberían reproducir la plasticidad sináptica.

En la figura A.4 se presentan los perfiles de facilitación - depresión, para los distintos valores de λ_1 y λ_2 estudiados en la figura A.3. Se observa que cuando $\lambda_1 = 5$ y $\lambda_2 = 50$, el número de *cuantos* liberados no sigue una distribución de Poisson (fig. A.3); no obstante, su perfil de facilitación - depresión se ajusta razonablemente bien a los datos experimentales (fig A.4 A). En cambio, cuando $\lambda_1 = 500$ y $\lambda_2 = 5$, el número de cuantos liberados sigue una distribución de Poisson, pero su perfil de facilitación - depresión no se ajusta a los datos experimentales (fig. A.4 C). Esto es una indicación que no todos los casos que conducen a la distribución de Poisson necesariamente reproducirán la plasticidad sináptica y viceversa.

Sin embargo, es interesante notar que de todos los casos analizados, tres de ellos reproducen ambas características de la sinapsis, la distribución de Poisson y el ajuste a los datos experimentales de facilitación y depresión. Estos son cuando $\lambda_1 = 50$ y $\lambda_2 = 50$ o $\lambda_2 = 500$ (fig A.4 B); ; y cuando $\lambda_1 = 500$ y $\lambda_2 = 50$ (fig. A.4 C). De esta forma, el modelo cinético sugiere de nuevo que a la fuerzas que previenen la liberación son al menos 50 veces mayores que la fuerzas que la promueven.

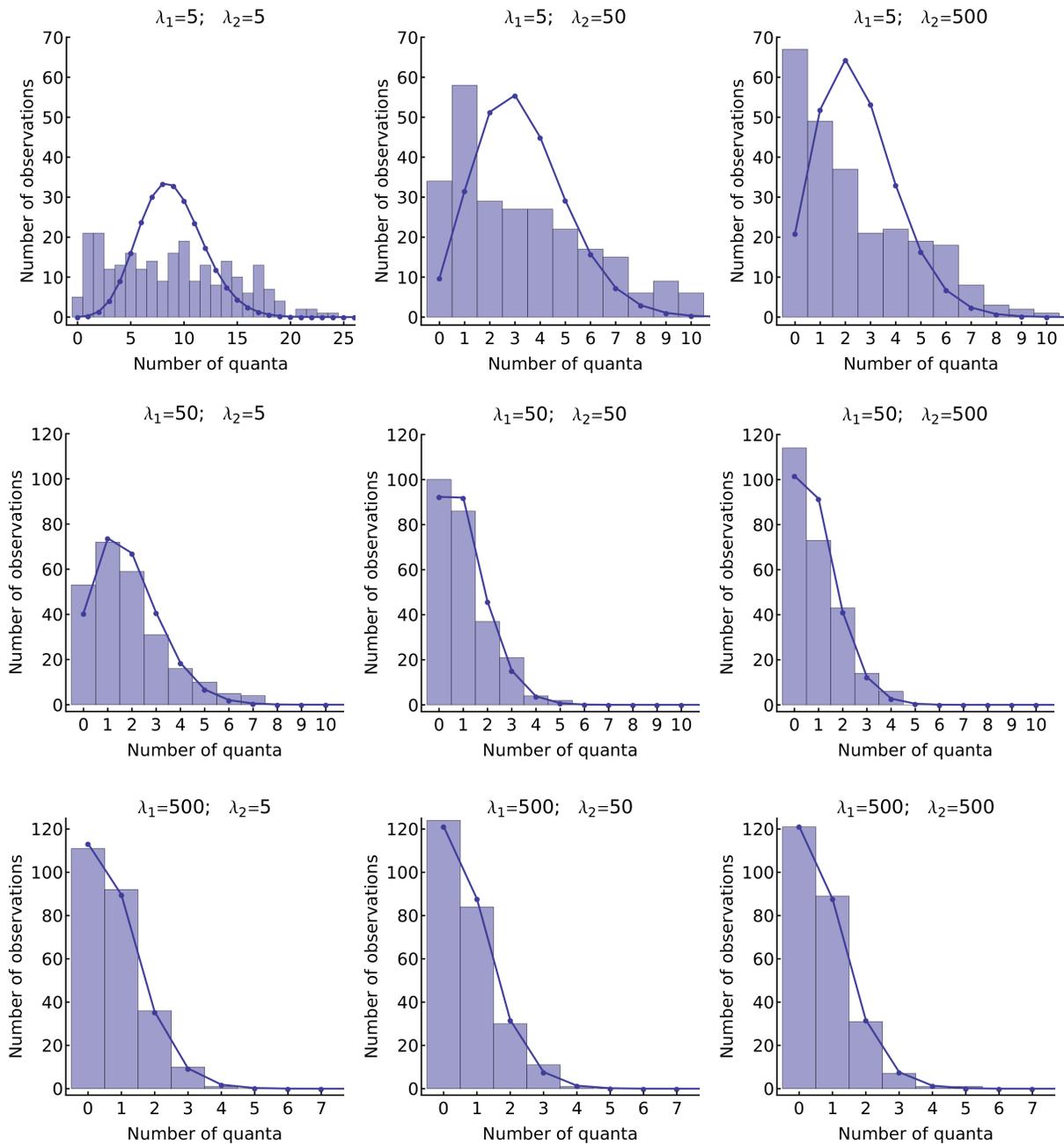


Figura A.3: Distribución del número de *cuantos* liberados por estímulo. Se simularon 250 estímulos con tiempo medio de duración de $\tau_e = 0.15$ ms. Los puntos unidos con líneas corresponden a una distribución de Poisson, con μ igual al número de *cuantos* promedio de cada caso. Con una prueba estadística de χ^2 de Pearson, se puede concluir que cuando $\lambda_1 = 5$, para ninguno de los tres valores de λ_2 los datos se distribuyen estadísticamente siguiendo una distribución de Poisson. En cambio, cuando $\lambda_1 \geq 50$ y $\lambda_2 \geq 50$, los datos ciertamente siguen una distribución de Poisson.

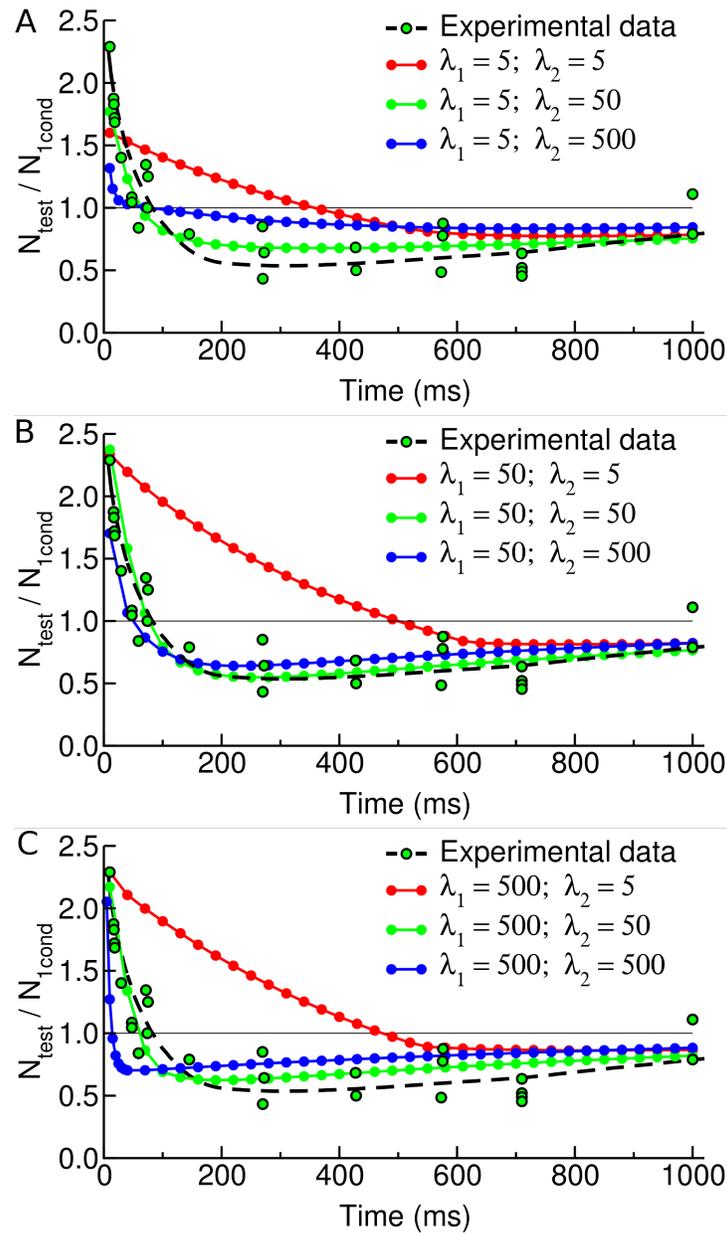


Figura A.4: Perfiles de facilitación - depresión de la respuesta de la sinápsis neuromuscular. Se simularon con el mismo protocolo de estimulación descrito en el capítulo 3, esto es, un tren de tres estímulos condicionantes con un estímulo adicional de prueba y con $\alpha_3 = 0.3 \text{ s}^{-1}$ y $\gamma = 1.0 \text{ s}^{-1}$. A) Resultados obtenidos cuando $\lambda_1 = 5$. Se observa que cuando $\lambda_2 = 50$, la simulación parece ajustarse bien a los datos experimentales. Sin embargo, como se muestra en la figura A.3, esta condición no reproduce la distribución de Poisson. B) Resultados obtenidos cuando $\lambda_1 = 50$. Cuando $\lambda_2 = 50$, obtenemos el caso estudiado en la capítulo 3. Observemos que cuando $\lambda_2 = 500$, la simulación parece reproducir los datos experimentales. C) Cuando $\lambda_1 = 500$ y $\lambda_2 = 50$, la simulación parece reproducir bien a los datos experimentales, además de que la fig. A.3 muestra que se obtiene una distribución de Poisson. Esto sugiere que las interacciones que evitan la liberación del transmisor tienen mayor relevancia que las interacciones que la promueven.

Bibliografía

- [1] B. Katz. *Nerve, Muscle and Synapse*. New Biology Series. McGraw-Hill Book Company, 1966.
- [2] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Taylor and Francis Group, 6 edition, 2014.
- [3] P. Fatt and B. Katz. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *The Journal of Physiology*, 117(1):109–128, 1952.
- [4] I. A. Boyd and A. R. Martin. Spontaneous subthreshold activity at mammalian neuromuscular junctions. *The Journal of Physiology*, 132(1):61–73, 1956.
- [5] J.G. Nicholls, R.A. Martin, P.A. Fuchs, J.W. Moore, and A.E. Stuart. *From Neuron to Brain*. 5th Ed. Sinauer Associates Incorporated, 2012.
- [6] J. del Castillo and B. Katz. Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *The Journal of Physiology*, 124(3):574–585, 1954.
- [7] I. A. Boyd and A. R. Martin. The end-plate potential in mammalian muscle. *The Journal of Physiology*, 132(1):74–91, 1956.
- [8] A. Mallart and A. R. Martin. The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *The Journal of Physiology*, 196(3):593–604, 1968.
- [9] B. Katz and R. Miledi. A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *The Journal of Physiology*, 192(2):407–436, 1967.
- [10] W. J. Betz. Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *The Journal of Physiology*, 206(3):629–644, 1970.
- [11] T. C. Südhof. The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1):509–547, 2004. PMID: 15217342.
- [12] S. O. Rizzoli and W. J. Betz. Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*, 6(1):57–69, 2005.

- [13] S. Truckenbrodt and S.O. Rizzoli. Synaptic vesicle pools: Classical and emerging roles. In Sumiko Mochida, editor, *Presynaptic Terminals*, pages 329–359. Springer Japan, 2015.
- [14] U. Becherer and J. Rettig. Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell and Tissue Research*, 326(2):393–407, 2006.
- [15] J. E. Heuser and T. S. Reese. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Cell Biology*, 57(2):315–344, 1973.
- [16] C. V. Rao and A. P. Arkin. Stochastic chemical kinetics and the quasi-steady-state assumption: Application to the Gillespie algorithm. *The Journal of Chemical Physics*, 118(11):4999–5010, 2003.
- [17] D. T. Gillespie. A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *Journal of Computational Physics*, 22(4):403 – 434, 1976.
- [18] D. T. Gillespie. A rigorous derivation of the chemical master equation. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 188(13):404 – 425, 1992.
- [19] C. Bustamante, J. Liphardt, and F. Ritort. The nonequilibrium thermodynamics of small systems. *Physics Today*, 58(7):43–48, 2005.
- [20] F. Li, F. Pincet, E. Perez, W.S. Eng, T. J. Melia, J. E. Rothman, and D. Tareste. Energetics and dynamics of snarepin folding across lipid bilayers. *Nat Struct Mol Biol*, 14(10):890–896, 2007.
- [21] T. C. Südhof and J. E. Rothman. Membrane fusion: Grappling with snare and sm proteins. *Science*, 323(5913):474–477, 2009.
- [22] J. A. Szule, M. L. Harlow, J. H. Jung, F. F. De-Miguel, R. M. Marshall, and U. J. McMahan. Regulation of synaptic vesicle docking by different classes of macromolecules in active zone material. *PLoS ONE*, 7(3):e33333, 03 2012.
- [23] J. del Castillo and B. Katz. Quantal components of the end-plate potential. *The Journal of Physiology*, 124(3):560–573, 1954.
- [24] R. Llinás, I.Z. Steinberg, and K. Walton. Presynaptic calcium currents in squid giant synapse. *Biophysical Journal*, 33(3):289–321, 1981.
- [25] E. R. Chapman. Synaptotagmin: A Ca^{2+} sensor that triggers exocytosis? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3:1–11, 2002.
- [26] E. W. Johnson and A. Wernig. The binomial nature of transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 218(3):757–767, 1971.

- [27] B. Katz and R. Miledi. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *The Journal of Physiology*, 195(1):481–492, 1968.
- [28] R. S. Zucker. Changes in the statistics of transmitter release during facilitation. *The Journal of Physiology*, 229(3):787–810, 1973.
- [29] A. Konnerth, R. Tsien, K. Mikoshiba, M.J. Berridge, J. Altman, G. Callewaert, and Human Frontier Science Program. *Coincidence Detection in the Nervous System: Molecular and Cellular Mechanisms, Consequence for Learning and Memory*. Human Frontier Science Program: Workshop. Human Frontier Science Program, 1996.
- [30] S. Nagwaney, M. L. Harlow, J. H. Jung, J. A. Szule, D. Ress, J. Xu, R. M. Marshall, and U. J. McMahan. Macromolecular connections of active zone material to docked synaptic vesicles and presynaptic membrane at neuromuscular junctions of mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 513(5):457–468, 2009.
- [31] D. T. Gillespie. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *The Journal of Physical Chemistry*, 81(25):2340–2361, 1977.
- [32] B.L. Ginsborg and D.H. Jenkinson. Transmission of impulses from nerve to muscle. In Eleanor Zaimis and Jennifer MacLagan, editors, *Neuromuscular Junction*, volume 42 of *Handbuch der experimentellen Pharmakologie / Handbook of Experimental Pharmacology*, pages 229–364. Springer Berlin Heidelberg, 1976.
- [33] D. T. Gillespie. Stochastic simulation of chemical kinetics. *Annual Review of Physical Chemistry*, 58(1):35–55, 2007. PMID: 17037977.
- [34] Luis Acerenza and Eduardo Mizraji. Cooperativity: a unified view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1339(1):155 – 166, 1997.
- [35] S. Truckenbrodt and S. O. Rizzoli. Spontaneous vesicle recycling in the synaptic bouton. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(409), 2014.