



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Localización específica de un mecanismo de autoinhibición
en las terminales de neuronas serotonérgicas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MIRIAM GARCÍA ÁVILA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. CITLALI TRUETA SEGOVIA**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 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.

1. Datos del alumno

García
Ávila
Miriam
50 34 45 07
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
30717620-6

2. Datos del tutor

Doctora.
Citlali
Trueta
Segovia

3. Datos del sinodal 1

Doctora.
Tatiana
Fiordelisio
Coll

4. Datos del sinodal 2

Doctora.
Gloria Acacia
Benítez
King

5. Datos del sinodal 3

Doctor.
Jaime Eduardo
Calixto
González

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Julio Alejandro
Prieto Sagredo

7. Datos del trabajo escrito

Localización específica de un mecanismo de autoinhibición en las
terminales de neuronas serotoninérgicas
64 p.
2016

AGRADECIMIENTOS

Han pasado tantas cosas para poder llegar a este punto y no encuentro un lugar más indicado para agradecer a todos aquellos que, aún sin sospecharlo, fueron indispensables para permitirme alcanzar este logro.

Quiero agradecer antes que a cualquiera y por sobre todas las cosas a mi Mamá y a mi Papá, por la confianza que han depositado en mí y el apoyo que me han dado para alcanzar mis sueños, pues todo lo que soy y lo que llegue a ser, es y será gracias a ustedes.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la educación de calidad a la que me permitió acceder y por cambiar mi manera de ver al mundo, permitiéndome pensar libremente y haberme dado las bases para contribuir en desarrollo de este país.

Al laboratorio de Neurofisiología Celular del INPRFM, y a todas sus integrantes, por recibirme y permitirme aprender de ustedes. En especial a Citlali, por dirigirme en la realización de este proyecto, por las oportunas correcciones, el apoyo brindado y sobre todo por las lecciones de ciencia que estoy segura nunca voy a olvidar.

A Ximena, por participar en la realización de este trabajo, por la alegría compartida en cada éxito obtenido y el apoyo en cada tropiezo, por esas tardes de café en el laboratorio y más aún por no sólo ser una compañera de trabajo, por ser una gran amiga. No me queda ninguna duda de que este trabajo es tan tuyo como mío.

A mis mejor amigos Zeltzin, Dulce, Everardo y Maleny, por esas platicas interminables, por aguantar mis frustraciones, calmar mis angustias y celebrar cada logro como suyo. Cada uno estuvo a mí lado a su manera y me dio los ánimos necesarios para conseguir este logro e iniciar nuevos proyectos. Gracias por permanecer en mi vida, donde espero mantenerlos siempre.

A Pablo, por sobrellevar mis muy frecuentes frustraciones, por aguantar mis ausencias, por estar a mi lado en cada momento, por leer este trabajo quizás más veces de las que yo misma lo hice y por devolverme los ánimos cada vez que las fuerzas se agotaban. No hay manera de agradecerle todo el amor y comprensión que me has brindado y lo invencible que me siento cuando tomas mi mano. Sigamos avanzando juntos.

A mis padres,
Guillermina Ávila y Fausto García

Índice

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1. <i>Metabolismo de la serotonina</i>	<i>4</i>
2.2. <i>El sistema serotoninérgico</i>	<i>6</i>
2.3. <i>Funciones de la serotonina.....</i>	<i>9</i>
2.4. <i>Secreción de serotonina</i>	<i>10</i>
2.5. <i>Secreción sináptica y perisináptica de serotonina.</i>	<i>12</i>
2.7. <i>Receptores de serotonina.....</i>	<i>16</i>
2.8. <i>Autoinhibición en neuronas serotoninérgicas.....</i>	<i>17</i>
2.9. <i>Sistema nervioso de la sanguijuela Hirudo sp. como preparación biológica.</i>	<i>22</i>
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVOS.....	26
6. MÉTODOS	27
6.1. <i>Cultivo celular.....</i>	<i>27</i>
6.2. <i>Registro intracelular.....</i>	<i>29</i>
6.3. <i>Análisis de resultados.....</i>	<i>31</i>
7. RESULTADOS	33
7.1. <i>Localización de la respuesta de autoinhibición.....</i>	<i>33</i>
7.2. <i>Participación de las vesículas electrodensas perisinápticas en el fenómeno de autoinhibición.....</i>	<i>39</i>
8. DISCUSIÓN	46
9. CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS.....	53

Resumen

En las neuronas serotoninérgicas la serotonina secretada activa mecanismos importantes de autorregulación. Este neurotransmisor es secretado tanto en las sinapsis como en sitios extrasinápticos del soma, las dendritas y los axones, mediante diferentes mecanismos y produciendo distintos efectos, por lo que es posible que los mecanismos de autorregulación en cada compartimento también sean distintos. Aquí estudiamos en qué sitio de la neurona se localiza un mecanismo de autoinhibición que había sido descrito previamente en las neuronas de Retzius del sistema nervioso central de la sanguijuela. En estas neuronas, la serotonina liberada en respuesta a la actividad eléctrica se une a autoreceptores acoplados a canales de cloro. El flujo de cloro hiperpolariza la membrana y disminuye su resistencia, y como consecuencia, la excitabilidad subsecuente se ve disminuida. Esto constituye un mecanismo de autoinhibición. Sin embargo no se conocía la localización específica de este mecanismo. Dos evidencias sugieren que este mecanismo de autoinhibición se localiza en las terminales presinápticas: 1) La respuesta autoinhibidora se observa después de potenciales de acción sencillos o a bajas frecuencias de disparo, que únicamente producen la liberación de serotonina a partir de vesículas claras en las terminales presinápticas y 2) En el soma de estas neuronas la serotonina activa un mecanismo distinto, que consiste en una retroalimentación positiva.

Para estudiar la localización del mecanismo de autoinhibición estimulamos neuronas en distintas condiciones experimentales en las que se conservan diferentes compartimentos de la neurona. La estimulación se llevó a cabo con trenes de diez impulsos a 10 Hz mediante microelectrodos en el soma. Medimos la respuesta autoinhibidora, amplificada e invertida por la inyección de cloro, como una despolarización de 16.9 ± 0.85 mV después del tren de estimulación en neuronas que se aislaron conservando un segmento del axón primario, donde en cultivo se forman terminales presinápticas cerca del soma. Sin embargo, en somas neuronales aislados sin axón, en los que no hay terminales sinápticas, o en

neuronas *in situ* en el ganglio nervioso, en las que las terminales presinápticas se encuentran electrotónicamente distantes del soma, no se observó la respuesta autoinhibidora, mostrando que el mecanismo de autoinhibición es exclusivo de las terminales nerviosas.

Para determinar si la serotonina liberada a partir de vesículas electrodensas en las zonas perisinápticas participa en el fenómeno de autoinhibición, bloqueamos los canales de calcio tipo L, que se requieren para producir liberación extrasináptica, pero no sináptica, con nimodipina 10 μM . La nimodipina disminuyó la amplitud de la respuesta autoinhibidora de manera específica y dependiente del tiempo, hasta en un 63%, indicando que la serotonina liberada de las vesículas perisinápticas también participa en la autoinhibición en las terminales.

Nuestros resultados muestran que el mecanismo que produce la respuesta de autoinhibición serotoninérgica en las neuronas de Retzius está localizado exclusivamente en las terminales presinápticas y que la liberación perisináptica a partir de vesículas electrodensas participa en su activación.

1. Introducción

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT), es una amina biógena que funciona como neurotransmisor y es uno de los menos abundantes en el sistema nervioso central (SNC); sólo el 1-2% de la serotonina del organismo se encuentra en el cerebro (aproximadamente el 90% se localiza en las células enterocromafines del aparato gastrointestinal y existe también una pequeña proporción en las plaquetas). Únicamente las neuronas y las células cromafines de la pared intestinal sintetizan serotonina.

En los vertebrados, las neuronas serotoninérgicas, cuyos cuerpos celulares se localizan en los núcleos del rafe del tallo cerebral, proyectan sus axones a todas las áreas del SNC, donde la serotonina modula una gran variedad de funciones y está involucrada en la patología de muchas enfermedades.

Los sistemas serotoninérgicos en diversos organismos tanto vertebrados como invertebrados se constituyen por números pequeños de neuronas. Sin embargo, la serotonina afecta todos los niveles de la función del sistema nervioso central y periférico, desde nervios sensoriales y salidas motoras hasta funciones complejas como el sueño, la atención y la conducta social. Esto sugiere que la secreción de serotonina se regula de maneras distintas en diferentes sitios del sistema nervioso central. En efecto, en la última década, se ha mostrado que la serotonina es secretada en terminales sinápticas, en sitios perisinápticos y en sitios extrasinápticos del soma, el axón y las dendritas y que las características de la secreción en cada sitio son distintas.

Una de las maneras en que se regula la secreción de muchos neurotransmisores es la que lleva a cabo el mismo transmisor sobre las neuronas que lo secretan, es decir, la autorregulación. La serotonina no es la excepción y actúa sobre autorreceptores en las neuronas serotoninérgicas, regulando su actividad eléctrica. Dado que los mecanismos que regulan la secreción de serotonina en diferentes sitios de la neurona son distintos, es posible que los mecanismos de autorregulación también lo sean. En este trabajo estudiamos la localización un

mecanismo de autoinhibición en neuronas serotoninérgicas identificadas y mostramos que se encuentra exclusivamente en las terminales presinápticas, pero no en sitios de liberación extrasináptica.

2. Antecedentes

2.1. Metabolismo de la serotonina

La serotonina no cruza la barrera hematoencefálica, por lo que la que se encuentra en el cerebro es sintetizada en el interior de las neuronas serotoninérgicas a partir del triptófano. Las neuronas no pueden sintetizar triptófano, por lo que el evento inicial en la síntesis de serotonina es el transporte facilitado de este aminoácido de la sangre al fluido cerebroespinal. Entonces, un importante determinante del nivel de serotonina en las neuronas serotoninérgicas es la cantidad relativa de triptófano en la dieta. Como resultado, los comportamientos asociados con la función de la serotonina son particularmente sensibles a la influencia de la dieta (Nicholls et al.,2011). La ausencia de triptófano en la dieta incrementa el comportamiento agresivo (Moeller et al.,1996) y produce cambios en el ciclo del sueño (Voderholzer et al.,1998).

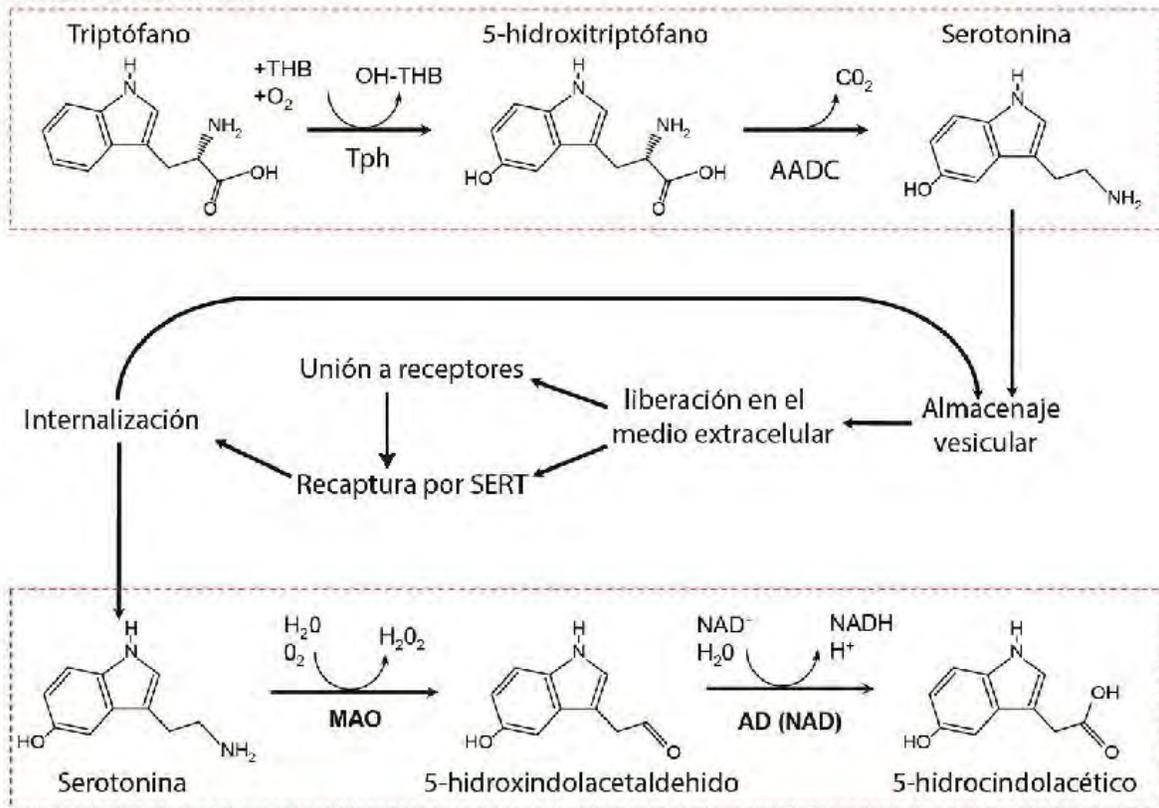
Una vez que el triptófano es captado por las neuronas por un transportador de la membrana plasmática, es transformado en 5-hidroxitriptófano (5-HTP por sus siglas en inglés) por la enzima hidroxilasa del triptófano (Tph por sus siglas en inglés) enzima que sólo se encuentra en las células que sintetizan la amina y de la cual existen dos isoformas: la Tph1, localizada en las células enterocromafines del tracto digestivo y la Tph2, que se encuentra en las neuronas centrales (Walther et al.,2003). El 5-HTP es transformado a serotonina (5-HT) por la descarboxilasa de aminoácidos l-aromáticos (AADC por sus siglas en inglés), la misma enzima que convierte a la dihidroxifenilalanina (DOPA por sus siglas en inglés) en dopamina. Con la estimulación, las neuronas liberan serotonina, lo que incrementa la tasa de conversión de triptófano a 5-HTP.

Dentro de la neurona la serotonina es almacenada en las vesículas a través del transportador vesicular de monoaminas (VMAT2 por sus siglas en inglés) que traslada la serotonina del citoplasma al interior de las vesículas para su futura liberación por exocitosis.

Una vez secretada la serotonina se une a receptores en la misma o en otras neuronas. La serotonina puede también ser recapturada por el transportador de membrana específico para serotonina (SERT, por sus siglas en inglés) en las neuronas serotoninérgicas y posteriormente es transportada de nuevo hacia el interior de las vesículas o es inactivada por la amino oxidasa mitocondrial (MAO por sus siglas en inglés) la cual la metaboliza hacia un intermediario inestable, el 5 hidroxindolacetaldehído, que es oxidado por la deshidrogenasa de aldehídos para formar ácido 5-hidroxindolacético (5-HIAA) (Figura 1). El aldehído puede también ser convertido en 5-hidroxitriptofol por una reductasa; sin embargo, en condiciones normales el camino predominante es la formación de 5-HIAA.

Los procesos de liberación, síntesis y metabolismo de la serotonina son regulados por diversos mecanismos, mismos que pueden ser sensibles a fármacos de uso clínico para el tratamiento de trastornos en el funcionamiento de los sistemas serotoninérgicos.

Síntesis de serotonina



Metabolismo de serotonina

Figura 1. Síntesis y metabolismo de serotonina, modificado de (Ruddell, Mann, y Ramm 2008).

2.2. El sistema serotoninérgico

El sistema serotoninérgico de vertebrados e invertebrados está compuesto por un número pequeño de neuronas que inervan todo el sistema nervioso. Por ejemplo, en el caracol, este serotoninérgico se constituye de sólo 4 neuronas localizadas en el primer ganglio abdominal (Heinrich et al., 1999; Hull et al., 1999). En la sanguijuela el sistema serotoninérgico está compuesto por 7 neuronas en cada uno de los ganglios segmentales, que contienen un total de 400 neuronas cada uno, mientras en el cerebro humano hay unas cuantas decenas de miles de neuronas serotoninérgicas, que constituyen una proporción de sólo una por cada millón de neuronas totales en el SNC (Jacobs y Azmitia 1992). En los mamíferos el sistema

serotonérgico está formado por un grupo de neuronas con morfologías diversas que se localizan en pocos núcleos del tallo cerebral (Aghajanian y Vandermaelen 1982; Steinbusch 1984), llamados núcleos del rafe, donde los cuerpos celulares de las neuronas serotonérgicas forman 9 grupos (B1-B9), que proyectan sus axones a toda la corteza cerebral, el cerebelo y la medula espinal (Figura 2; Dahlstroem y Fuxe 1964).

La organización general de los núcleos del rafe y la distribución de las neuronas serotonérgicas es muy similar en todos los mamíferos. El sistema serotonérgico puede dividirse en tres subdivisiones, el rafe dorsal y núcleo medio, que forman la división rostral y el complejo caudal. La división rostral está separada de la división caudal por un espacio en la mitad del tallo cerebral que carece de este tipo de células.

Las neuronas dentro del complejo rostral (línea caudal, rafe dorsal y núcleo medio del rafe) proyectan primariamente a la corteza cerebral, tálamo y cerebelo, en contraste con las neuronas del complejo caudal del rafe (núcleo del rafe magnus, rafe obscurus, rafe pallidus y parte de la formación reticular lateral) que proyectan principalmente al núcleo del tallo cerebral, y a la medula espinal (Hornung 2004). Los núcleos del rafe difieren en la proporción de neuronas serotonérgicas; el grupo rostral contiene alrededor del 85% de todas las neuronas serotonérgicas, mientras que el grupo caudal contiene como máximo el 15% (Törk 1990; Hornung 2004). A menudo se colocan la sustancia P y la serotonina en los somas de las neuronas. Actualmente, es un hecho constatado que ninguna región del SNC de los mamíferos carece de la inervación serotonérgica.

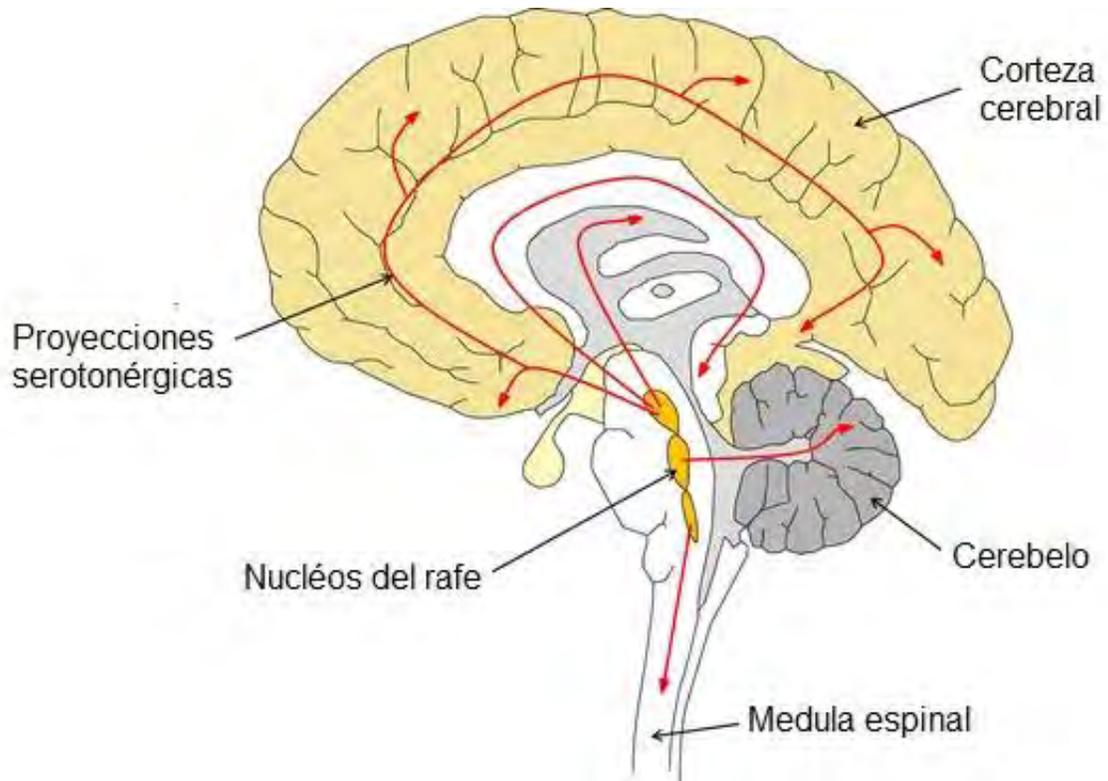


Figura 2. Esquema representativo de las proyecciones del sistema serotoninérgico en el SNC humano. Las neuronas serotoninérgicas se encuentran en los núcleos del rafe del tallo cerebral. Los axones de estas neuronas proyectan hacia el cerebro anterior, el tálamo, el hipocampo, el cuerpo estriado, la corteza, el bulbo raquídeo, la protuberancia, el mesencéfalo, el cerebelo y la médula espinal.

2.3. Funciones de la serotonina

La serotonina puede actuar como neurotransmisor de manera local en las terminales sinápticas, como modulador paracrino al difundirse hacia neuronas vecinas, o como hormona al ser liberada en la sangre por órganos secretores y recorrer grandes distancias por la circulación general (De-Miguel y Trueta 2005).. Además, funciona como mediador en el sistema nervioso periférico, modulando por ejemplo, la motilidad intestinal (Lüllmann, Mohr, y Hein 2010).

La serotonina desempeña un importante papel en el comportamiento social, la agresividad (Raleigh et al.,1991), la regulación del apetito, la conducta alimenticia (Breisch, Zemlan, y Hoebel 1976), la termorregulación, (Moeller et al.,1996), el comportamiento sexual (Hull et al.,1999), el aprendizaje y la memoria, la actividad motora (Jacobs y Fornal 1993), la modulación del dolor, la regulación del sueño (Voderholzer et al.,1998), de la función supragenocortical y de la presión arterial (Pérez y Fernández 2008), así como en la neurogénesis (Lauder y Krebs 1978).

Las funciones de la serotonina están conservadas desde los invertebrados hasta los seres humanos. Por ejemplo, en la sanguijuela las neuronas serotoninérgicas regulan el nado, la locomoción y la alimentación y en los mamíferos este tipo de neuronas también modulan la locomoción y otros movimientos rítmicos y regulan procesos de la alimentación (Jacobs y Fornal 1993). Además, en los mamíferos las alteraciones en el sistema serotoninérgico están implicadas en daños somáticos y cognitivos así como en desordenes afectivos.

El hecho de que unas pocas neuronas regulen tan diversas e importantes funciones nos indica que el funcionamiento de los mecanismos de liberación de serotonina y la modulación que ésta lleva a cabo, deben estar finamente regulados, posiblemente de manera diferente en distintas áreas del sistema nervioso.

2.4. Secreción de serotonina

La serotonina es almacenada en vesículas secretoras, que son transportadas hacia la membrana plasmática y ante un estímulo adecuado se fusionan con ésta para liberar su contenido al exterior celular por exocitosis. Este proceso es similar en varios tipos de células, incluyendo las neuronas y las células endocrinas. La exocitosis involucra a dos familias de proteínas Rab que contribuyen en el anclaje de las vesículas a la membrana y al complejo SNARE (Receptor Soluble Sensible a la N-etil-D-maleimida), que facilita la fusión de las membranas (Silverthorn 2008). Este complejo es responsable del anclaje de las vesículas a la membrana plasmática de las terminales nerviosas y consiste de la proteína v-SNARE (sinaptobrevina) y las proteínas t-SNARE (syntaxina y SNAP25). En la sinapsis la maquinaria SNARE básica esta modulada por el calcio censado por la sinaptotagmina y por una proteína adicional llamada complexina.

Para que las vesículas puedan liberar su contenido, se acoplan a la membrana plasmática y el complejo SNARE las ensambla parcialmente, pero la complexina impide la fusión. La despolarización de la membrana producida por la actividad eléctrica de la célula produce la apertura de canales de calcio sensibles al voltaje, que permiten la entrada de calcio al citoplasma. Una vez dentro, el calcio se une a la sinaptotagmina. Esto abre un poro de fusión entre la membrana de la vesícula y la membrana plasmática, y otros reordenamientos completan la fusión de la vesícula y liberan la maquinaria de proteínas SNARE, que ahora puede volverse a utilizar. En las terminales presinápticas la disposición de la maquinaria de fusión permite que responda en cuestión de microsegundos a la entrada del calcio, lo cual es esencial para la rápida y repetitiva señalización. La secreción se bloquea en ausencia de calcio extracelular o aumentando la concentración de magnesio, que bloquea los canales de calcio, lo que muestra que el calcio debe estar presente en el medio extracelular para que ocurra la liberación (Katz y Miledi 1970).

Las vesículas secretoras en neuronas y en células endocrinas pueden ser de dos tipos diferentes: unas tienen un diámetro de alrededor de 40 nm y al microscopio electrónico se ven translúcidas, por lo que se les llama vesículas claras; las otras tienen un diámetro de alrededor de 100 nm y al microscopio electrónico muestran un núcleo oscuro, por lo que se les llama vesículas electrodensas o vesículas de núcleo denso. Estas últimas tienen un volumen 16 veces mayor que el de las claras y por ello contienen más neurotransmisor (Bruns y Jahn, 1995).

La serotonina es secretada en las sinapsis y en sitios extrasinápticos del soma, las dendritas y los axones. Los mecanismos que producen y regulan la secreción en cada uno de estos compartimentos son distintos y la serotonina secretada en cada uno de estos sitios produce distintos efectos (De-Miguel y Trueta 2005; Trueta y De-Miguel 2012). En la sinapsis, la llegada de un impulso eléctrico a las terminales de la neurona presináptica produce la liberación inmediata de serotonina a partir de unas cuantas vesículas sinápticas claras. Debido a que la terminal postsináptica se encuentra a sólo unos nanómetros de distancia del sitio de liberación del neurotransmisor, este tipo de secreción se caracteriza por tener efectos rápidos y localizados. Por el contrario, la secreción extrasináptica requiere de la actividad eléctrica repetitiva a altas frecuencias y libera cantidades mucho mayores de neurotransmisor. En este caso la serotonina es liberada sin contar con una contraparte postsináptica cercana, por lo que es necesario que alcance a otras neuronas por difusión en el fluido extracelular. Por ello sus efectos son más lentos y difusos y tienen una duración más prolongada que los de la secreción sináptica. La secreción extrasináptica contribuye a lo que ha sido llamado transmisión paracrina o transmisión por volumen (Agnati et al., 1986).

Casi todo lo que se conoce sobre los mecanismos finos de liberación de serotonina, tanto en las terminales sinápticas como en sitios extrasinápticos, se ha estudiado en las neuronas de Retzius aisladas del sistema nervioso central de la sanguijuela. Este sistema nervioso tiene muchas ventajas para estudiar principios básicos de la neurobiología, como se describe en la última sección de los antecedentes.

2.5. Secreción sináptica y perisináptica de serotonina.

En las terminales de las neuronas de Retzius hay una poza de vesículas lista para liberar, y una poza de reserva, que constan de vesículas claras. Las vesículas de la poza lista para liberar se fusionan con la membrana presináptica en la zona activa de la sinapsis y liberan su contenido en respuesta a potenciales de acción individuales. Por su parte, la poza de reserva es movilizada ante estímulos repetitivos para mantener la liberación sináptica ante la actividad eléctrica sostenida. Ambas pozas de vesículas claras se encuentran rodeadas por vesículas electrodensas, que liberan su contenido en la periferia de las terminales nerviosas (Figura 3) ante la actividad eléctrica repetitiva a frecuencias a partir de 2 Hz (Trueta y De-Miguel, en preparación).

De manera general la liberación sináptica depende de la entrada de calcio a partir de los canales de calcio dependientes de voltaje N, P, y Q que en la sanguijuela no han sido identificados porque no responden a las toxinas que se utilizan en vertebrados para bloquearlos. Los canales de calcio tipo L no participan en la exocitosis sináptica (Reuter 1996) pero sí en la liberación a partir de vesículas electrodensas en las zonas perisinápticas (Trueta y De-Miguel, en preparación) y en el soma (Trueta et. al. 2003).

La estimulación a frecuencias bajas como 1 Hz produce la liberación del contenido de las vesículas claras en las terminales sinápticas, mientras que frecuencias mayores producen la liberación a partir de vesículas claras y electrodensas. La liberación sináptica a partir de vesículas claras se facilita a frecuencias entre 2 y 5 Hz y se deprime a frecuencias mayores, mientras que la liberación perisináptica a partir de vesículas electrodensas se activa en respuesta a la estimulación a frecuencias partir de 2 Hz pero requiere de frecuencias de 20 Hz o mayores para alcanzar su máxima eficiencia (Trueta y De-Miguel, en preparación). Esto se explica porque las vesículas electrodensas están más distantes de la membrana y a pesar de que requieren de una menor concentración de calcio para fusionarse con la membrana (Mansvelder y Kits 2000) es necesario que el calcio difunda

hasta los sitios donde se encuentran, por lo que se necesita de estimulación a frecuencias altas para lograrlo.

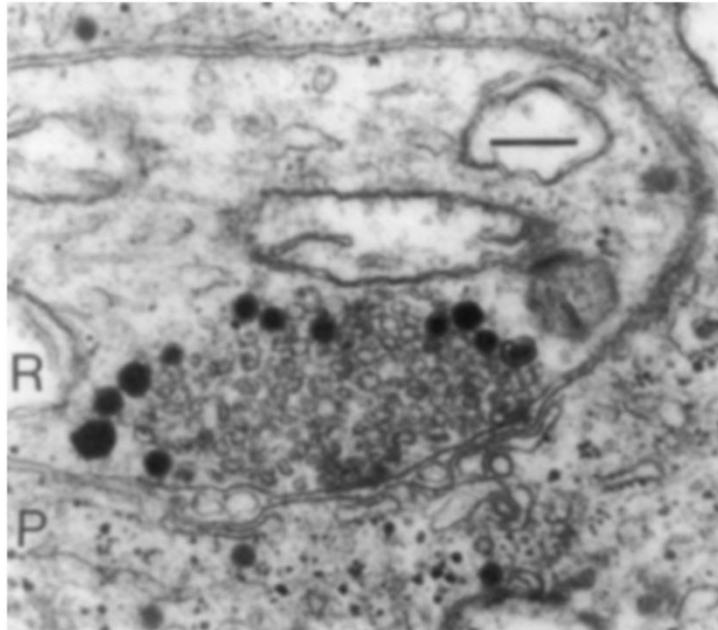


Figura 3. Micrografía de una sinapsis Retzius-P de 5 días. La célula de Retzius tiene un grupo de vesículas claras adosadas a la membrana presináptica. Las vesículas claras están rodeadas por vesículas de núcleo denso. Frente a la densidad presináptica la hendidura sináptica es más ancha que en las áreas extrasinápticas. Barra de escala 0.2 μm tomado de (Kuffler, Nicholls, y Drapeau 1987).

2.6. Secreción extrasináptica

En la última década se ha mostrado que, además de la liberación sináptica, prácticamente todos los neurotransmisores conocidos son secretados a partir del soma de distintos tipos de neuronas en vertebrados e invertebrados. Por ejemplo, la dopamina es liberada por el soma de neuronas en la sustancia nigra y de células amacrinas en la retina; la noradrenalina en el locus coeruleus; la acetilcolina en neuronas de la medula espinal de *Xenopus*; el glutamato en astrocitos y en células gliales en el bulbo olfatorio y el ácido γ -aminobutírico (GABA) en células amacrinas de la retina (para revisión ver Trueta y De-Miguel 2012), además de varios péptidos. Este tipo de liberación es similar a la de las células endocrinas.

En el soma de las neuronas serotoninérgicas de Retzius, la liberación ocurre a partir de cúmulos de vesículas electrodensas, que en reposo se encuentran a más de una micra de la membrana plasmática y requieren de la estimulación a altas frecuencias para liberar su contenido. La estimulación con trenes de impulsos a 10 Hz, pero no a 1 Hz moviliza las vesículas hacia la membrana plasmática (Trueta et al., 2003; Trueta et al., 2004) y produce su fusión y la liberación de serotonina. Esta liberación depende de la activación de canales de calcio tipo L y de la liberación de calcio inducida por calcio (Trueta et al., 2003; Trueta et al., 2004; Leon-Pinzon et al., 2014), y es sostenida durante varios minutos por un mecanismo de autorregulación que consiste en una retroalimentación positiva, donde la serotonina liberada se une a autoreceptores acoplados a la fosfolipasa C, que produce IP₃, lo que activa la liberación de calcio de depósitos intracelulares en la región sub-membranal, y permite la fusión de las vesículas conforme llegan a la membrana plasmática (Figura 4; Leon-Pinzon et al., 2014).

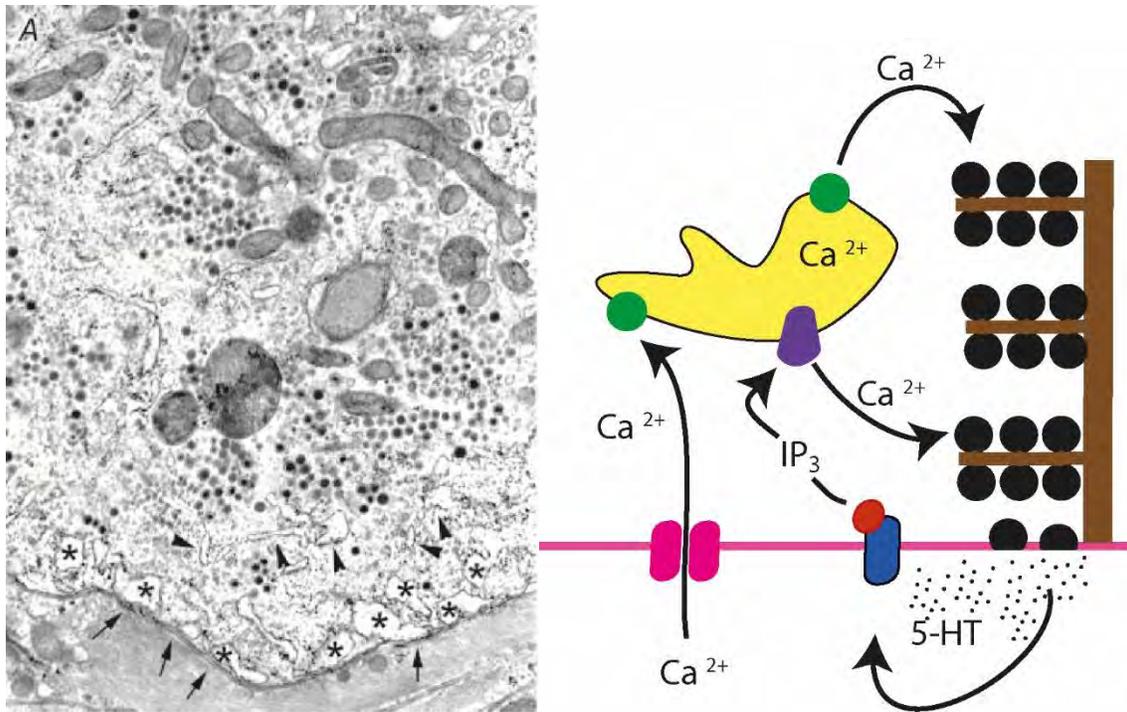


Figura 4. Soma de una neurona de Retzius. A) Micrografía del soma de una neurona de Retzius, se muestran grupos de vesículas en el soma de una neurona estimulada a 1 Hz distantes de la membrana, marcada con flechas. Entre los cúmulos de vesículas y la membrana plasmática se observan cisternas de retículo endoplásmico (asteriscos). Las puntas de flecha marcan el retículo endoplásmico rugoso, (tomada de Trueta et al., 2004). B) Esquema del mecanismo de autorregulación de la secreción somática. En el soma la serotonina secretada actúa sobre autoreceptores acoplados a la producción de IP_3 , lo que activa la liberación de calcio intracelular, y mantiene la secreción por varios minutos (modificado de Leon-Pinzon et al., 2014).

2.7. Receptores de serotonina

Se han identificado gran cantidad de receptores serotoninérgicos, la mayoría de los cuales son metabotrópicos. Estos han sido relacionados con determinados comportamientos, que incluyen las emociones, el ritmo circadiano, la conducta motora y el estado de alerta mental. El deterioro de la función de los receptores se considera responsable de muchos trastornos psiquiátricos como depresión, trastornos de ansiedad y esquizofrenia; los fármacos que actúan sobre los receptores serotoninérgicos son tratamientos eficaces para algunos de estos trastornos. Los receptores serotoninérgicos son puntos diana para una amplia variedad de agentes terapéuticos. La activación de los receptores también media la saciedad y el menor consumo de alimento, siendo útiles para el tratamiento de los trastornos de la conducta alimentaria (Purves 2007).

Los receptores de serotonina pueden dividirse en al menos siete clases, las cuales se han numerado del 5-HT₁ a 5-HT₇. Las clases 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₅ comprenden a su vez, cinco (5-HT_{1A} a 5-HT_{1F}), tres (5-HT_{2A} a 5-HT_{2C}) y dos (5-HT_{5A} a 5-HT_{5B}) subtipos respectivamente, mientras que de las clases 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ se conoce hasta el momento un subtipo de cada una.

Todos los receptores de serotonina están relacionados estructuralmente con la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, excepto el receptor 5-HT₃, el cual está acoplado a un canal catiónico de sodio y potasio (Gerhardt y van Heerikhuizen 1997).

La mayoría de los receptores de serotonina han sido ampliamente estudiados en neuronas de vertebrados; en neuronas de invertebrados las subunidades de los receptores pueden tener variaciones que no son reconocidas por los agonistas y antagonistas de los receptores de vertebrados.

En neuronas de sanguijuela se ha mostrado la presencia de tres tipos de receptores de serotonina, descritos en las neuronas P (sensibles a presión) y en neuronas de Retzius, donde se mostró que la administración de serotonina

produce una corriente de cloro y una corriente catiónica monovalente (Lessmann y Dietzel 1991). La corriente de cloro es activada por un receptor ionotrópico y uno metabotrópico diferente de los subtipos descritos en mamíferos que está acoplado a la formación de AMP cíclico y es dependiente de la proteína cinasa A; la corriente catiónica parece ser activada por un receptor similar al 5HT₂, acoplado a la proteína cinasa C (Sanchez-Armass, Merz, y Drapeau 1991).

2.8. Autoinhibición en neuronas serotoninérgicas

Las neuronas que liberan serotonina cuentan con características comunes en las especies de diferentes Phylla (Gocht y Heinrich 2007). Una de estas características es que la actividad eléctrica en ráfagas a frecuencias altas, produce una autoinhibición mediada por las propiedades eléctricas intrínsecas de la membrana plasmática. Además, las neuronas serotoninérgicas presentan autoreceptores en las dendritas, axones y el cuerpo celular (para revisión ver Aghajanian et al., 1990) y por ello la propia serotonina activa también mecanismos de autorregulación. Este último tipo de autorregulación, mediado por el neurotransmisor, no es exclusivo de la serotonina; la autoinhibición también ha sido descrita en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (Cheramy, Leviel, y Glowinski 1981; Grace y Bunney 1984; Kita, Kita, y Kitai 1986), donde el disparo es inhibido por la aplicación de dopamina exógena, además de las neuronas magnocelulares secretoras de vasopresina (Brown 2004), y las neuronas noradrenérgicas en el locus coeruleus (Aghajanian y VanderMaelen 1982).

Las neuronas serotoninérgicas disparan espontáneamente a bajas frecuencias, entre 0.5 y 3 Hz (Cunningham y Lakoski 1988; Mason 1997; Wang y Aghajanian 1977). La inhibición mediada por las propiedades intrínseca de la membrana consiste en un período de supresión de los potenciales de acción espontáneos después de fases de alta frecuencia de estimulación (Gocht y Heinrich 2007). Durante estos periodos la actividad espontanea no se ve afectada por la aplicación de serotonina exógena, por lo que la supresión es explicada por las propiedades

de la membrana (Heinrich et al.,1999). Este tipo de autoinhibición ha sido descrito en neuronas serotoninérgicas del caracol (Heinrich et al.,1999) y en neuronas de Retzius *in situ* dentro de los ganglios nerviosos de la sanguijuela (Carretta 1988).

En la región somatodendrítica de las neuronas serotoninérgicas de los vertebrados existe una alta densidad de receptores 5-HT inhibidores. Periodos de alta frecuencia de disparo evocados experimentalmente por estimulación eléctrica, son seguidos de una inhibición, durante la cual no se generan potenciales de acción (Aghajanian y Vandermaelen 1982; Wang y Aghajanian 1977) y se ha observado que la aplicación de antagonistas de los autoreceptores serotoninérgicos (Fornal et al.,1994; Rogawski y Aghajanian 1981; Trulson y Frederickson 1987) abolen estos periodos de supresión. Además la presencia de serotonina exógena (Chaput, Blier, y de Montigny 1986; Trulson y Crisp 1986) inhibe la actividad espontanea, lo cual indica que la serotonina en el fluido extracelular actúa uniéndose a autoreceptores (Gocht y Heinrich 2007) y produce una autoinhibición en la actividad eléctrica de las neuronas que la secretan.

En neuronas de Retzius de la sanguijuela en cultivo nuestro laboratorio se mostró que inmediatamente después de uno o varios potenciales de acción se presenta una hiperpolarización más lenta que la producida por la corriente de potasio que participa en la repolarización de la membrana después del potencial de acción. Esta hiperpolarización lenta es mediada por corrientes de cloro, pues al invertir el gradiente transmembranal de cloro, inyectando KCl a la neurona con un electrodo intracelular, se invierte. Esta respuesta se inhibe al bloquear la secreción sustituyendo el calcio extracelular por magnesio o cuando se vacían las reservas de serotonina con reserpina, lo cual muestra que es producida por la serotonina liberada por la propia neurona (Figura 5: Cercos et al.,2009).

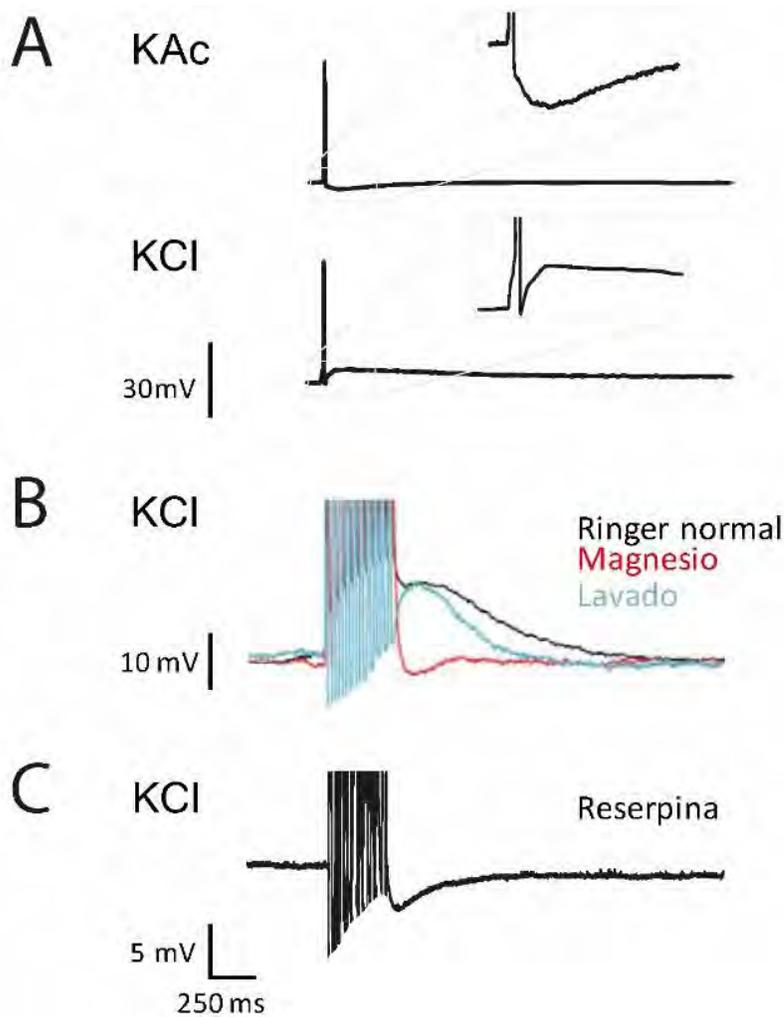


Figura 5. Las neuronas de Retzius presentan un cambio de voltaje postpotencial que es mediado por corrientes de cloro y se debe a la liberación de serotonina (tomado de Cercos et al., 2009). A) Potencial de acción registrado con un electrodo lleno de KAc (trazo superior; condiciones fisiológicas) y con un electrodo lleno de KCl (trazo inferior) para invertir el gradiente transmembranal de cloro. Los insertos muestran ampliaciones del potencial de membrana justo alrededor del potencial de acción. La inversión del cambio de voltaje postpotencial muestra que es producido por corrientes de cloro. B) y C) Registros representativos de neuronas estimuladas con un tren de 10 impulsos a 30 Hz con un electrodo lleno de KCl; los potenciales de acción se muestran truncados. B) La respuesta postpotencial, que se observa como un despolarización después del tren de impulsos (trazo negro) se inhibe al bloquear la secreción sustituyendo el calcio por magnesio en la solución extracelular (trazo rojo) de manera reversible (trazo azul). Esto muestra que es producida por una sustancia secretada por la propia neurona. C) La respuesta postpotencial se inhibe al vaciar las reservas de serotonina, incubando a las células con reserpina. Esto muestra que es producida por la serotonina secretada por la propia neurona.

En este mecanismo la serotonina liberada en respuesta a la actividad eléctrica actúa sobre autoreceptores acoplados a canales de cloro (Figura 7), lo que hiperpolariza la membrana y disminuye su resistencia, disminuyendo así la excitabilidad subsecuente de la neurona (Figura 6; Cercós, De-Miguel, y Trueta 2009).

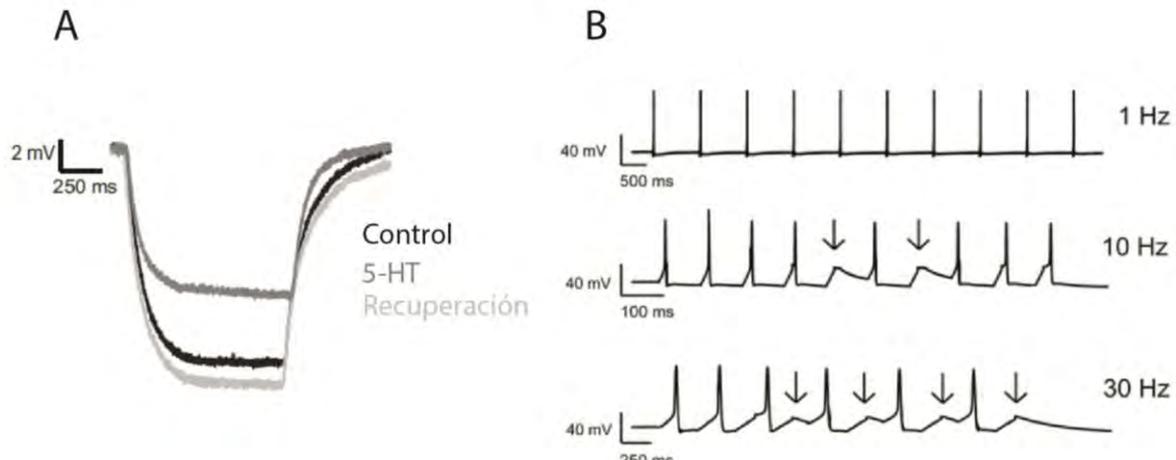


Figura 6. La serotonina produce una disminución de la resistencia y de la excitabilidad de las neuronas Retzius. A) Respuesta de una neurona Retzius en cultivo a pulsos de corriente hiperpolarizante antes (control; trazo negro), durante (5-HT; trazo gris oscuro) y después (Recuperación; trazo gris claro) de la aplicación de serotonina por iontoforesis. La disminución de la respuesta en voltaje producida por la serotonina a la aplicación de un pulso de corriente de igual magnitud muestra que la serotonina disminuye la resistencia de la membrana. B) Registros de una neurona Retzius estimulada con un tren de 10 impulsos a 1 Hz (trazo superior), 10 Hz (trazo medio), o 30 Hz (trazo inferior) usando un electrodo intracelular lleno de KAc. El porcentaje de fallas de los potenciales de acción (indicadas por flechas) aumentó al incrementar la frecuencia de estimulación, mostrando que la serotonina liberada por la neurona disminuye la excitabilidad de la misma. Nótese que la escala de tiempo es diferente en cada caso. Escala vertical aplica para todos los trazo. (modificado de Cercos, De-Miguel, y Trueta 2009)

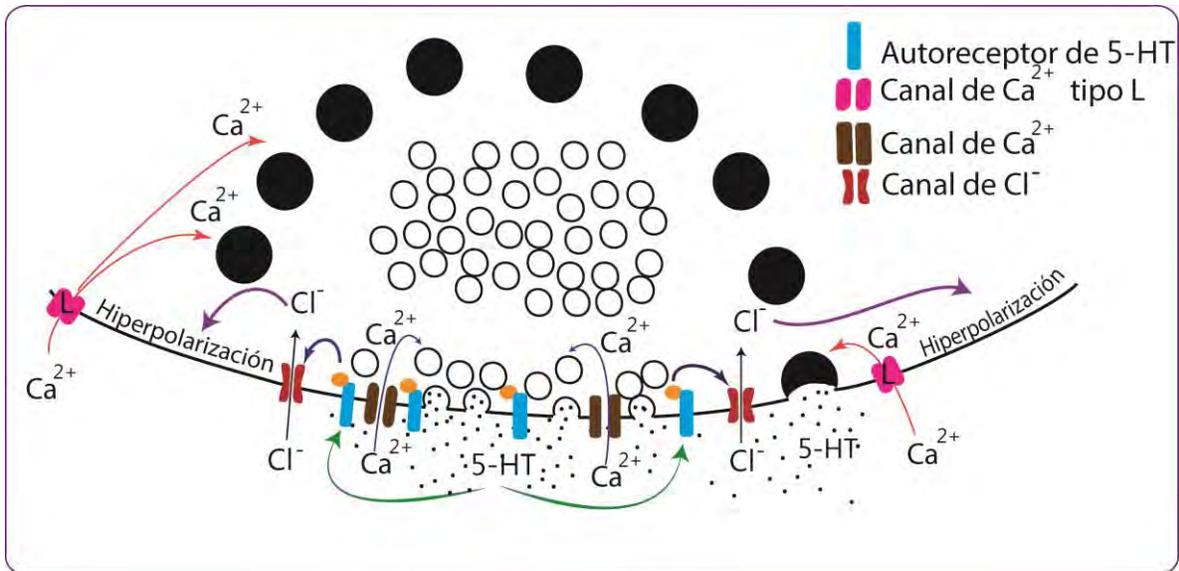


Figura 7. Representación esquemática del mecanismo de autoregulación activado por la serotonina en las neuronas de Retzius. A) La serotonina liberada actúa sobre autoreceptores acoplados a canales de cloro, lo que hiperpolariza la membrana y disminuye su resistencia, disminuyendo así la excitabilidad de la neurona. No se conoce la localización específica de este mecanismo.

Dado que esta autoinhibición se observa después de potenciales de acción individuales, que producen la liberación de serotonina únicamente de vesículas claras en las terminales sinápticas, el mecanismo que lo produce parece estar localizado en o cerca de las terminales presinápticas. Además, como se mostró en la sección de secreción extrasináptica, en el soma de estas mismas neuronas existe un mecanismo distinto. Sin embargo, la localización del mecanismo que produce la autoinhibición no había sido demostrada. En este trabajo estudiamos la localización de este mecanismo en las neuronas de Retzius. Además, como ya se ha mencionado, en las terminales sinápticas las vesículas claras están rodeadas por vesículas electrodensas que liberan su contenido en la zona perisináptica, produciendo efectos postsinápticos y posiblemente también extrasinápticos y no se conocía si esta liberación extrasináptica participa en la activación del fenómeno de autoinhibición. En este trabajo estudiamos también la participación de la secreción perisináptica en la activación del mecanismo de autoinhibición.

2.9. Sistema nervioso de la sanguijuela *Hirudo sp.* como preparación biológica.

Las funciones fisiológicas de la serotonina están conservadas a lo largo de la escala filogenética (Tecott 2007) y los mecanismos de secreción también lo están, por lo que podemos estudiarlos en las neuronas de invertebrados, que tienen la ventaja de ser más grandes que las de los vertebrados y de encontrarse localizadas de manera estereotipada, es decir, su localización es similar entre un ganglio y otro, entre un individuo y otro e incluso en distintas especies. Todo esto permite identificar cada tipo neuronal y facilita realizar registros ópticos y electrofisiológicos. Uno de los invertebrados que más se ha utilizado para estudiar principios básicos de la neurobiología es la sanguijuela.

La sanguijuela pertenece al Phylum Annelida, cuya característica más distintiva es su cuerpo segmentado a lo largo del eje anteroposterior, lo cual se refleja claramente en la organización de su SNC (Ruppert y Litvaitis 1968).

La estructura y funcionamiento del sistema nervioso de la sanguijuela ha sido caracterizado por décadas (Coggeshall y Fawcett 1964). Está compuesto por 21 ganglios segmentales, además de uno cefálico y uno caudal, formados por la fusión de varios ganglios. Cada uno de los ganglios segmentales contiene alrededor de 400 neuronas, exceptuando los ganglios 5 y 6, que inervan los órganos reproductores y contienen alrededor de 700 neuronas (Muller 1981). Cada ganglio está conectado al cuerpo por medio de raíces nerviosas y con los ganglios adyacentes por medio de nervios conectivos (Figura 8; John G. Nicholls et al., 2011).

En las sanguijuelas es posible estudiar neurona por neurona las bases celulares de la conducta debido a que tienen comportamientos estereotipados que son llevados a cabo por relativamente, pocas neuronas, mientras que respuestas análogas en mamíferos requieren de muchos miles de neuronas (John G. Nicholls et al., 2011).

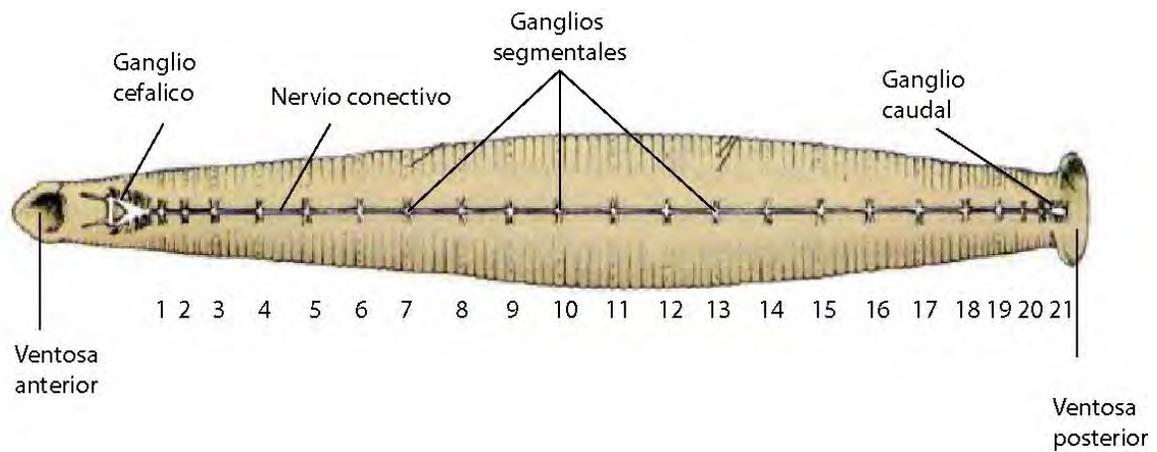


Figura 8. Esquema del sistema nervioso central de la sanguijuela. Se muestran los 21 ganglios segmentales (tomado de (Blackshaw y Nicholls 1995))

La mayoría de las neuronas de la sanguijuela han sido identificadas por su tamaño, localización y función (Nicholls y Baylor 1968); entre ellas están las neuronas mecanosensoriales sensibles a la presión (P), al tacto (T), o a los estímulos nocivos (N) y las motoneuronas, de las cuales se han descrito 14 pares excitadores y 3 pares inhibidores. (Figura 9).

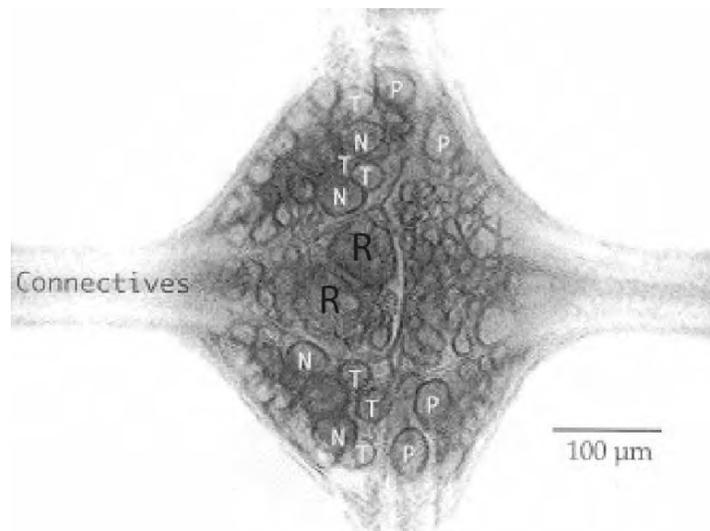


Figura 9. Fotomicrografía de un ganglio segmental de *Hirudo sp.* Se muestra el aspecto ventral del ganglio donde se observan los cuerpos celulares de las neuronas identificadas N, T, P y R (Retzius) tomada de (Brodfuehrer y Thorogood 2001).

En las sanguijuelas el sistema serotoninérgico se encuentra conformado por 7 neuronas en cada ganglio segmental, (Coggeshall y Fawcett 1964). Estas neuronas modulan el nado, la alimentación (Hull et al., 1999; Lent y Frazer 1977), la tensión muscular y la liberación de moco en la piel (Lent 1973; Leake 1986; Lent y Dickinson 1987; Carretta 1988). Las dos neuronas de Retzius, cuyos somas se localizan en el paquete central de cada ganglio segmental, son las mayores productoras de serotonina y las más grandes en todo el ganglio, con un soma de aproximadamente de 80 micras de diámetro, por lo que son fáciles de registrar de manera óptica y electrofisiológica. La estimulación eléctrica de las neuronas de Retzius incrementa la propensión de las sanguijuelas a nadar, y durante el nado estas neuronas permanecen activas. Estas neuronas pueden también ser aisladas y mantenidas en cultivo, donde continúan liberando serotonina (Henderson 1983) y pueden formar sinapsis funcionales con otras neuronas co-cultivadas (Ready y Nicholls 1979). Cuando las neuronas de Retzius se siembran en contacto con una neurona sensible a la presión (P) forman una sinapsis química unidireccional en la cual la célula Retzius siempre actúa como neurona presináptica y la serotonina está contenida en vesículas claras y electrodensas en la termina (Kuffler, Nicholls, y Drapeau 1987) (Figura 3). Esta preparación fue la primera sinapsis establecida en cultivo (Fuchs, Nicholls, y Ready 1981), ha sido utilizada para estudiar los pasos en la formación de sinapsis, y es muy útil para estudiar los mecanismos finos de la exocitosis sináptica de serotonina (Kuffler y Nicholls, 1990). Además, las neuronas de Retzius liberan serotonina a partir de vesículas electrodensas en sitios extrasinápticos del soma (Trueta et al., 2003, 2004) y del axón (Cercós et al., en preparación).

El hecho de que en cultivo las neuronas sean prácticamente isopotenciales y las terminales se encuentren cerca del cuerpo neuronal hace que el registro en el soma sea una fiel muestra de lo que ocurre en las terminales.

3. Planteamiento del problema

La respuesta de autoinhibición mediada por corrientes de cloro en las neuronas de Retzius de la sanguijuela (Cercós, De-Miguel, y Trueta 2009) puede ser registrado inmediatamente después de un solo potencial de acción. Dado que los potenciales de acción individuales evocan sólo secreción sináptica a partir de vesículas claras, esto sugiere que el mecanismo que produce la autoinhibición está localizado en o cerca de las terminales presinápticas. Además, en el soma de estas mismas neuronas se describió un mecanismo de autorregulación diferente, que consiste en una retroalimentación positiva que sostiene la secreción durante minutos (Leon-Pinzon et al., 2014). Estas evidencias sugieren que el mecanismo de autoinhibición mediado por canales de cloro se localiza específicamente en las terminales presinápticas.

En las terminales presinápticas las pozas de vesículas claras están rodeadas por vesículas electrodensas, que liberan su contenido en la zona perisináptica. En caso de que el mecanismo de autoinhibición se localice en las terminales, no se conoce tampoco si la serotonina liberada por vesículas electrodensas participa en la activación de este mecanismo.

En este trabajo investigamos 1) si el mecanismo de autoinhibición mediado por corrientes de cloro se encuentra localizado específicamente en las terminales presinápticas y 2) si la serotonina liberada por vesículas electrodensas en los alrededores de la terminal presináptica participa en la activación del mecanismo de autoinhibición.

Demostrar que el mecanismo de autoinhibición está localizado de manera específica en las terminales presinápticas y si la serotonina liberada por vesículas electrodensas en la zona perisináptica participa en la activación del mecanismo de autoinhibición en la terminal, apoyaría la idea de que la liberación de serotonina en diferentes compartimentos neuronales es regulada por mecanismos diferentes y contribuirá a entender con mayor detalle el funcionamiento del sistema serotoninérgico.

4. Hipótesis.

-Si el fenómeno de autoinhibición ocurre exclusivamente en las terminales presinápticas, entonces no estará presente en somas de neuronas aislados sin el axón primario o crecimiento neurítico, ni se registrará con electrodos en el soma de neuronas *in situ* dentro del ganglio nervioso, donde las terminales están electrotónicamente alejadas del soma.

-Si la liberación perisináptica a partir de vesículas electrodensas participa en el fenómeno de autoinhibición, entonces la respuesta autoinhibidora disminuirá al inhibir la liberación a partir de vesículas electrodensas.

5. Objetivos

-Determinar si el fenómeno de autoinhibición ocurre exclusivamente en las terminales sinápticas.

-Investigar si la liberación perisináptica a partir de vesículas electrodensas participa en el fenómeno de autoinhibición.

6. Métodos

6.1. Cultivo celular

Para aislar las neuronas de Retzius se realizó la disección de la sanguijuela bajo un microscopio estereoscópico siguiendo el protocolo de Dietzel et al., (1986). Se sujetó al animal con alfileres sobre una caja con fondo de sylgard (Dow Corning, MI, EUA) y se mantuvo bañado con una solución fisiológica pH 7.4 que contiene: 120 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂ y 10 mM de Tris-maleato. Se realizó un corte longitudinal en la parte ventral para exponer la cadena ganglionar y se cortó el seno venoso que la recubre, conservando las raíces cubiertas con este tejido para facilitar la sujeción de los ganglios. Una vez aislada la cadena ganglionar, se colocó en una caja de cultivo de 3 cm de diámetro con fondo de sylgard con medio de cultivo L-15 (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) complementado con: 2% de suero bovino fetal (SBF; Gibco), 6mg/ml de glucosa y 0.1 mg/ml de gentamicina. La cápsula que recubre cada ganglio se abrió con ayuda de un par de pinzas finas.

Para eliminar la matriz extracelular del rededor de las neuronas y facilitar la extracción de éstas, los ganglios descapsulados se incubaron durante una hora con 2 mg/ml de colagenasa-dispasa, con agitación continua. Después de esto, bajo el microscopio estereoscópico, se identificaron las neuronas de Retzius por su tamaño y localización (Figura 10).

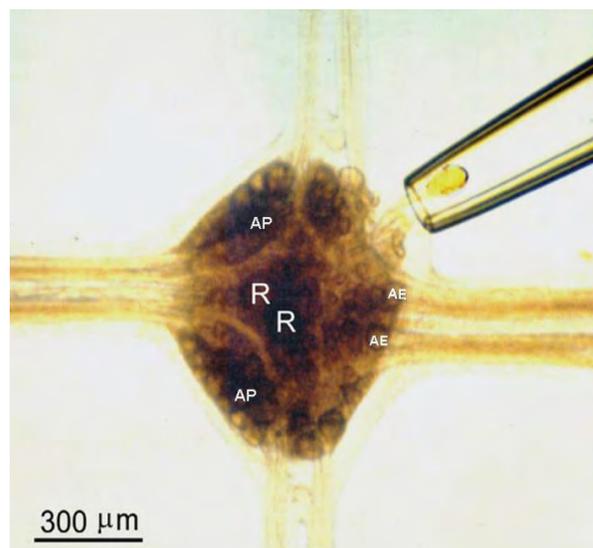


Figura 10. Aislamiento de neuronas identificadas de un ganglio segmental. La pipeta está aislando una neurona P por succión. Las R señalan las neuronas de Retzius (tomado de Dietzel et al., 1986).

El aislamiento de las neuronas se realizó por medio de succión realizada con una micropipeta de vidrio, con la cual se puede extraer el soma unido a un segmento del axón primario (muñón axonal), aplicando succión hasta que el soma y parte del axón entren en la micropipeta, seguido de un rápido movimiento perpendicular; o aislar únicamente el soma, sin la presencia del muñón axonal, aplicando succión hasta que sólo el soma entre en la micropipeta, seguido de un rápido movimiento perpendicular.

Una vez extraídas las neuronas se lavaron en gotas de medio de cultivo estéril dentro de una campana de flujo laminar y se sembraron al día siguiente en platos de cultivo (Falcon Franklin Lakes, NJ, USA), incubados previamente con concanavalina-A 2 mg/ml (Sigma) por 1 hora, y enjuagados con agua desionizada estéril. Las neuronas se mantuvieron con 3 ml de medio de cultivo L-15 (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) complementado con 6 mg/ml de glucosa y 0.1 mg/ml de gentamicina. Las células fueron sembradas asegurándose de que tanto el soma como el muñón axonal estuvieran en contacto con el fondo del plato, 12 horas después se adicionó 2% de SBF (Gibco). Las células se mantuvieron a una temperatura de 18°C y se utilizaron entre 2 y 7 días después de haberlas sembrado.

6.2. Registro intracelular

La estimulación y registro de las neuronas se hizo utilizando un microelectrodo intracelular de borosilicato, con resistencia entre 20 y 30 M Ω , lleno de KCl 3M, para invertir el gradiente transmembranal de cloro y poder medir la respuesta de autoinhibición invertida y amplificada. Los registros se realizaron con un amplificador de registro intracelular AXOCLAMP-2A (Axon Instruments) en modo de fijación de corriente discontinua y se digitalizaron con un convertidor analógico-digital Digitada 1322A (Axon Instruments), con una frecuencia de muestreo de 10 KHz, utilizando el software Pclamp 9.0 (Axon Instruments). El potencial de reposo se mantuvo en -60 mV por medio de la inyección de corriente directa (siempre menor a 1 nA) para evitar variaciones en la amplitud de la respuesta pspotencial por la diferencia entre el potencial de reposo y el potencial de equilibrio del cloro.

Para los registros de neuronas de Retzius *in situ*, se aislaron los ganglios y se colocaron en un plato con fondo de sylgard con solución fisiológica adicionada con 11 mM de glucosa, sujetándolos de las raíces y conectivos con minucias. Los registros intracelulares se realizaron utilizando óptica de campo oscuro para poder visualizar las neuronas y el microelectrodo.

Las neuronas se estimularon con pulsos de corriente despolarizante de 20 ms de duración y con amplitud suficiente para producir un potencial de acción durante cada pulso. Se produjeron trenes de 10 impulsos a 1 Hz, con la finalidad de estandarizar la amplitud de corriente necesaria para que la neurona disparara en cada uno de los pulsos del tren; se esperaron 2 minutos antes de la siguiente estimulación, en la cual se produjo un tren de 10 impulsos a 10 Hz. El potencial de reposo de las neuronas fue mantenido a -60 mV mediante la inyección de corriente directa. Se esperó un tiempo de 5 minutos entre cada tren de 10 Hz para permitir la recuperación de las vesículas secretoras.

Con la finalidad de estudiar las variaciones en la presencia del fenómeno de autoinhibición en los diferentes compartimentos las neuronas fueron separadas en 4 grupos:

1. Neuronas con muñón axonal con crecimiento neurítico: Estas neuronas fueron aisladas conservando un segmento del axón primario y presentaron crecimiento neurítico después de ser sembradas (Figura 11A). En estas neuronas se forman terminales presinápticas en la punta del muñón axonal y/o en las neuritas y debido a que las neuronas en cultivo son prácticamente isopotenciales, las respuestas registradas en el soma reflejan claramente la respuesta de las terminales presinápticas.
2. Neuronas con axón primario en cultivo: Estas neuronas fueron aisladas conservando un segmento del axón primario y no presentaron crecimiento neurítico después de ser sembradas (Figura 11B). En estas condiciones también se forman terminales presinápticas en la punta del muñón axonal y las neuronas son también prácticamente isopotenciales.
3. Somas en cultivo: Estas neuronas fueron aisladas conservando únicamente el soma neuronal aislado del axón primario, y no presentaron crecimiento neurítico después de ser sembradas (Figura 11C). Al tener aislado sólo el soma de la neurona donde no hay terminales presinápticas, se pudo estudiar la respuesta de este compartimento en particular.
4. Neuronas en los ganglios nerviosos: Estas neuronas fueron registradas *in situ* dentro de los ganglios nerviosos (Figura 11D), conservando las ramificaciones axonales intactas, donde las terminales presinápticas se encuentran en las puntas de los axones, que están electrotónicamente alejadas del soma.

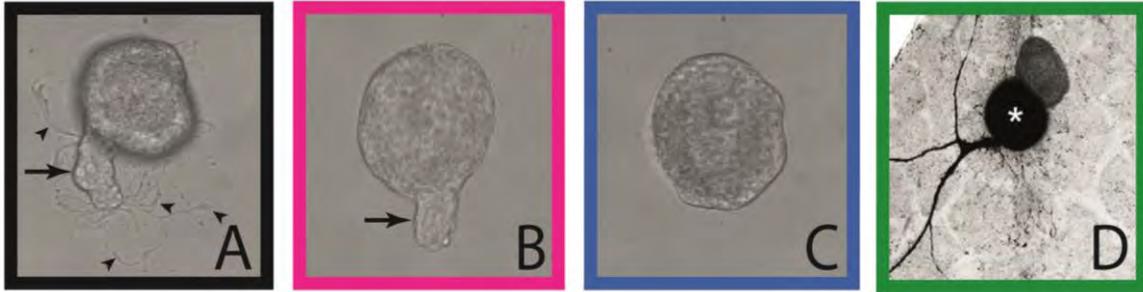


Figura 11. Neuronas de Retzius en diferentes condiciones experimentales. A) Neurona aislada conservando un segmento del axón primario (señalado por la flecha), donde en cultivo se forman terminales presinápticas cerca del soma. Esta neurona regeneró neuritas (puntas de flecha). B) Neurona aislada conservando un segmento del axón primario (flecha), que no regeneró neuritas. C) Soma aislado, donde no hay terminales presinápticas. D) Neuronas *in situ* dentro del ganglio nervioso, donde las terminales presinápticas se encuentran electrotónicamente distantes del soma (tomada de (Yazdani et al., 2013)).

6.3. Análisis de resultados

Los resultados donde se muestra la media y el error estándar fueron calculados a partir de una muestra de al menos 6 datos para cada condición.

En las gráficas donde se muestran porcentajes, los datos fueron normalizados tomando como 100% el dato del primer registro de cada neurona.

Se realizó una prueba de “t” de Student, para comparar la media de dos grupos independientes. Para comparar más de dos grupos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor. En algunos experimentos donde se realizaron mediciones en distintos tiempos, se utilizó ANOVA de medidas repetidas. Para determinar cuáles grupos difieren, a cada ANOVA se le aplicó una prueba de rango post hoc de Tukey.

Se consideró que había una diferencia significativa cuando la probabilidad de error fue menor al 5% ($P < 0.05$).

En cada registro, se midió la amplitud de la respuesta autoinhibidora invertida como la diferencia entre el potencial de reposo de la neurona antes del tren de

estimulación y el punto máximo de la respuesta postpotencial; la duración media de la respuesta autoinhibidora fue medida como el tiempo que tardó dicha respuesta en decaer al 50% de la amplitud máxima alcanzada, tomando como tiempo inicial el pico del último potencial de acción del tren (Figura 12).

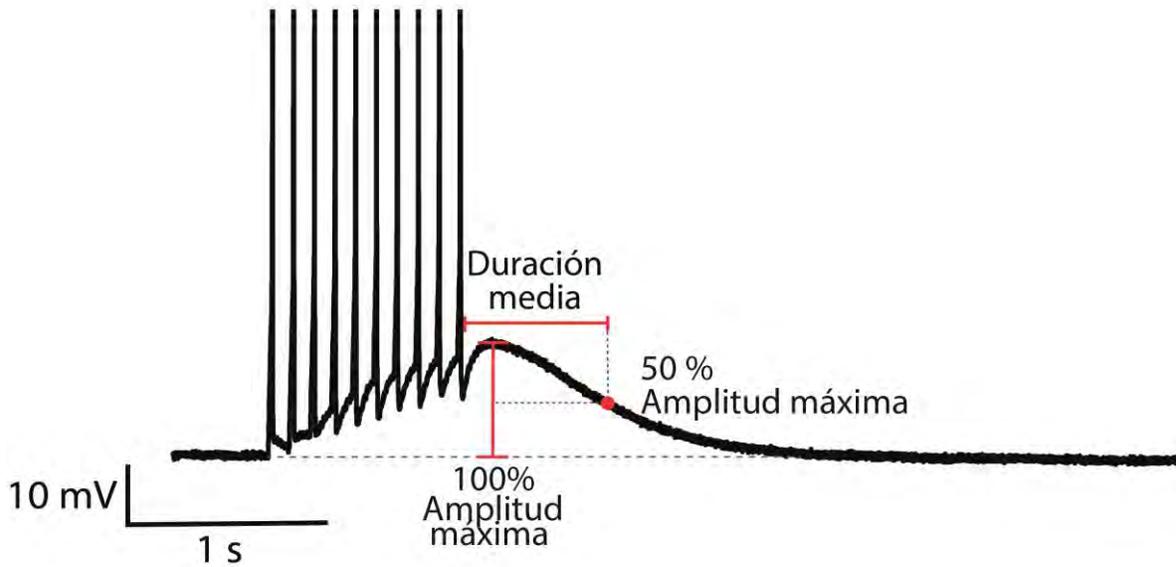


Figura 12. Se muestra cómo se midieron la amplitud máxima y la duración media de la respuesta de autoinhibición.

7. Resultados

7.1. Localización de la respuesta de autoinhibición.

Para estudiar si el mecanismo de autoinhibición mediado por corrientes de cloro se localiza específicamente en las terminales presinápticas, utilizamos neuronas de Retzius del sistema nervioso central de la sanguijuela en diferentes condiciones experimentales, que se describieron con detalle en la sección de métodos. Las neuronas se estimularon con trenes de 10 impulsos a 10 Hz mediante la inyección de corriente con un microelectrodo en el soma, lleno de KCl 3 M para invertir y amplificar la respuesta de autoinhibición.

La respuesta de autoinhibición se registró como una despolarización después del disparo de uno o más potenciales de acción. La amplitud y duración de esta despolarización presentó una ligera variación de una célula a otra. Sin embargo, la cinética de la respuesta fue muy similar dentro y entre los grupos que la presentaron (Figura 13).

En las neuronas de Retzius que fueron aisladas conservando un segmento del axón primario (muñón axonal), la estimulación con trenes a 10 Hz produjo una despolarización gradual a lo largo del tren, que siguió creciendo hasta alcanzar un pico con una amplitud de 16.9 ± 0.85 mV, 566.1 ± 1.39 ms después del último potencial de acción (Figura 13). Esto ocurrió independientemente de si las neuronas regeneraron o no neuritas a partir del muñón axonal.

En algunas neuronas el muñón axonal se apreciaba muy pequeño o delgado al ser cultivadas. Estas neuronas, no presentaron respuesta de autoinhibición. Sin embargo, en aquellas neuronas donde el muñón axonal tenía un grosor y tamaño similar al mostrado en la figura 11B, presentaban respuesta postpotencial aunque no hubieran regenerado neuritas y esta fue muy similar a la registrada en células que regeneraron neuritas (Figura 13).

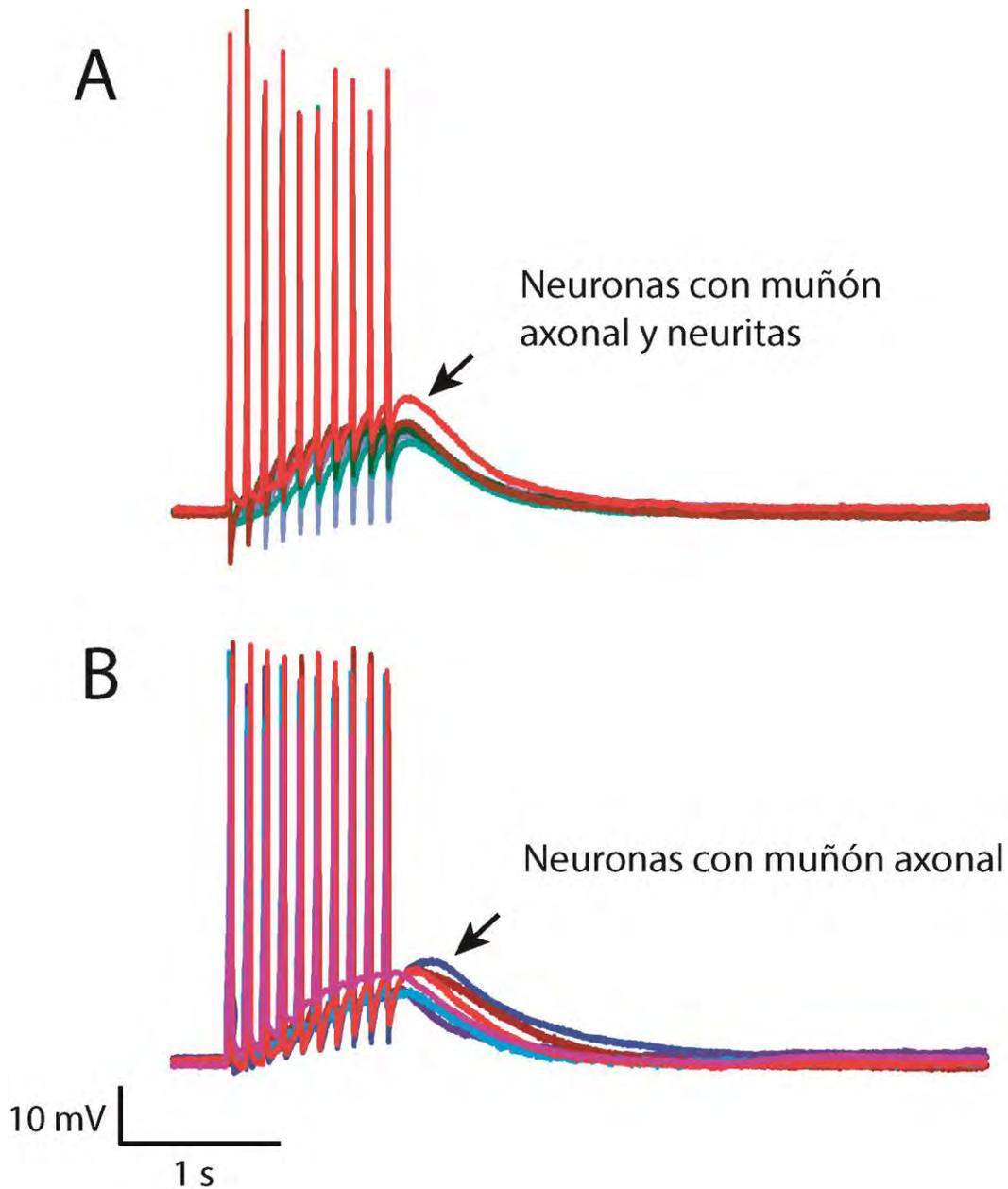


Figura 13. Registros representativos de neuronas de Retzius en cultivo que fueron aisladas conservando un segmento del axón primario.

Las neuronas fueron estimuladas con un tren de 10 pulsos a 10 Hz. La respuesta de autoinhibición se muestra como una despolarización después de la estimulación (flechas). Cada trazo corresponde a una neurona independiente. A) Se muestran respuestas de neuronas que regeneraron neuritas B) Se muestran respuestas de neuronas que no regeneraron neuritas pero presentaban un muñón axonal saludable. Nótese que la variabilidad en la amplitud y cinética de la respuesta de autoinhibición es similar en ambos grupos. Se muestran los registros de 6 neuronas por grupo.

En neuronas que fueron aisladas conservando un segmento del axón primario pero que en cultivo no regeneraron neuritas, la respuesta de autoinhibición tuvo una amplitud máxima de 16.795 ± 1.352 mV, mientras que en las neuronas que en cultivo regeneraron neuritas la respuesta de autoinhibición tuvo una amplitud máxima 16.970 ± 1.122 mV (Figura 13). No hubo diferencia significativa entre la amplitud de la respuesta entre estos dos grupos.

En los registros realizados en somas neuronales aislados sin axón primario, donde no hay terminales presinápticas (Figura. 14) se presentó una repolarización lenta después del tren, que 150 ms después del último potencial de acción del tren (tiempo en que la respuesta de autoinhibición en las neuronas que la presentaron, alcanzó su amplitud máxima), tenía una amplitud de 1.686 ± 0.263 mV por encima del potencial de reposo. Esta amplitud fue significativamente menor que la registrada en neuronas que fueron aisladas conservando un segmento del axón primario y la repolarización no tuvo la cinética de la respuesta de autoinhibición. Esto sugiere que el mecanismo de autoinhibición no está presente en el soma de las neuronas.

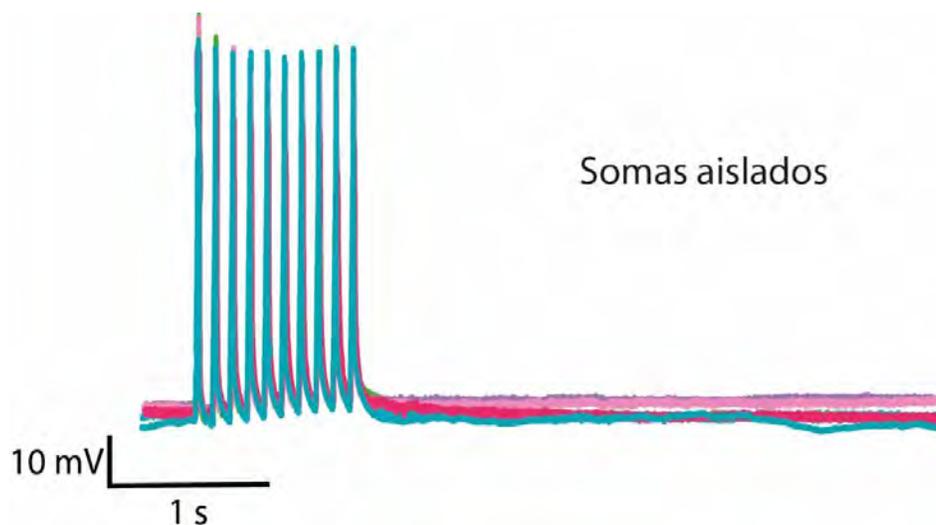


Figura 14. Registros representativos de neuronas de Retzius en cultivo que fueron aisladas sin el axón primario.

Las neuronas fueron estimuladas con un tren de 10 pulsos a 10 Hz. Nótese que la repolarización lenta después de la estimulación no tiene las características de la respuesta de autoinhibición. Se muestran los registros de 6 neuronas independientes.

El axón primario de las neuronas de Retzius tiene sitios de secreción extrasináptica (Cercós et al., en preparación), que podrían presentar el mecanismo de autoinhibición. Para comprobar si este mecanismo es exclusivo de las terminales presinápticas y no está presente en sitios extrasinápticos del axón primario, se realizaron registros en neuronas de Retzius *in situ* dentro de los ganglios nerviosos. En estas condiciones, las terminales presinápticas están electrotónicamente distantes del soma, en las puntas de las ramificaciones axonales y si la autoinhibición está localizada únicamente en las terminales no se debería ver su efecto registrando con microelectrodos en el soma. En cambio, el axón primario está en la misma posición en relación con el soma que en las neuronas en cultivo y si el mecanismo de autoinhibición está localizado en este compartimento y es activado por la secreción extrasináptica de serotonina de éste, debería ser posible ver su efecto en el soma de las neuronas registradas *in situ*. La Figura 15, muestra registros de neuronas de Retzius en cultivo e *in situ*, estimuladas con trenes de diez impulsos a 10 Hz. En las neuronas *in situ* no se registró la respuesta de autoinhibición después de la estimulación, sugiriendo que el mecanismo de autoinhibición está localizado exclusivamente en las terminales presinápticas y la propagación electrotónica de las respuestas generadas en las terminales no permite que lleguen al soma.

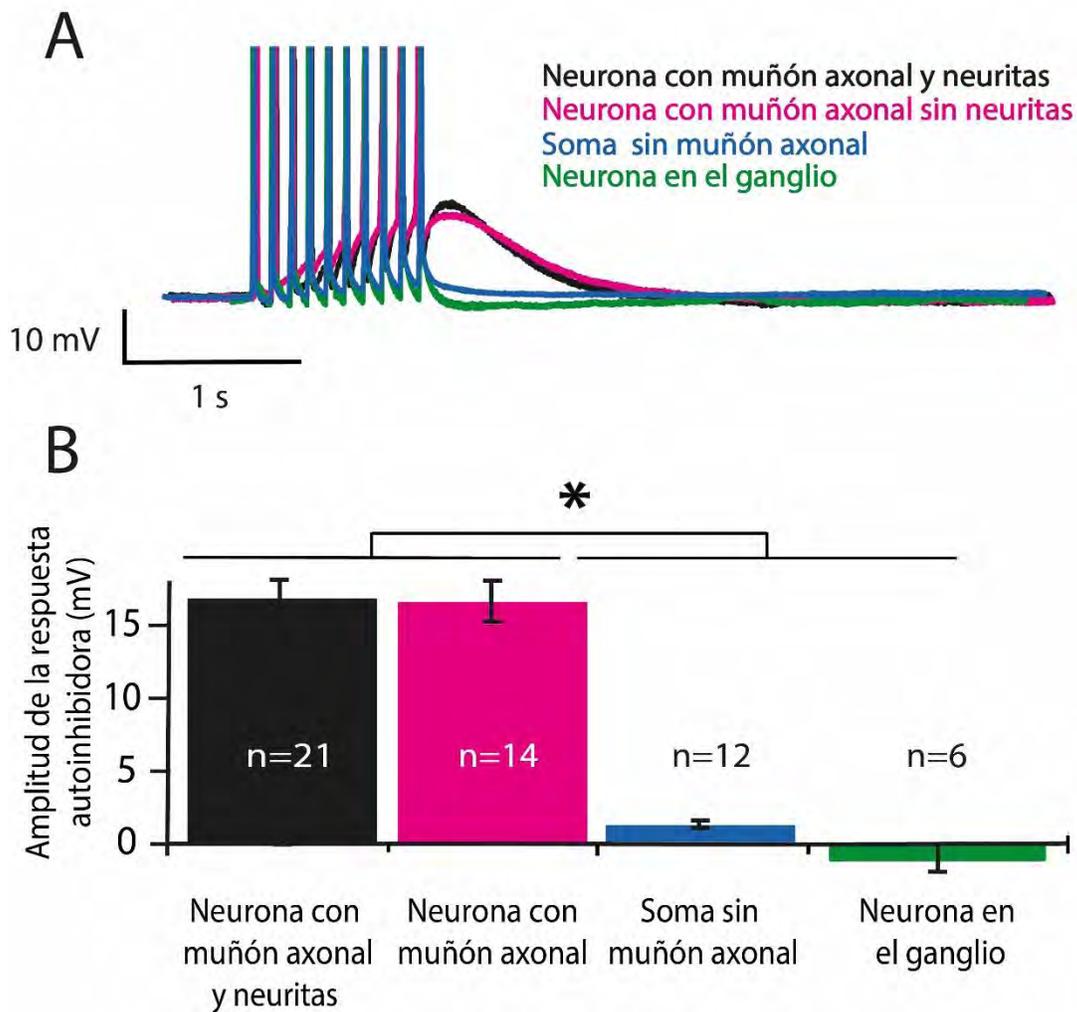


Figura 15. Respuesta de autoinhibición en diferentes condiciones experimentales.

A) Registros representativos de neuronas de Retzius con diferentes condiciones en cultivo e *in situ*, estimuladas con un tren de 10 pulsos a 10 Hz. La respuesta de autoinhibición sólo se registró en neuronas que fueron aisladas conservando un segmento del axón primario, donde en cultivo se forman terminales presinápticas cerca del soma. Los potenciales de acción se muestran truncados. B) Promedio de la amplitud máxima de la respuesta autoinhibidora para cada grupo. No hay diferencia significativa si la neurona regeneró o no neuritas. La hiperpolarización observada en los registros *in situ* se debe a la corriente de potasio que se activa al final del potencial de acción.

Como indicador de la cinética del mecanismo de autoinhibición se utilizó la duración media de la respuesta. Al comparar este parámetro entre los grupos con muñón axonal con (560.3 ± 1 ms) y sin (571.9 ± 1.7 ms) neuritas (Figura 16), no se encontró diferencia significativa, demostrando que a pesar de las diferencias morfológicas de las neuronas, la cinética de la respuesta autoinhibidora no se ve afectada.

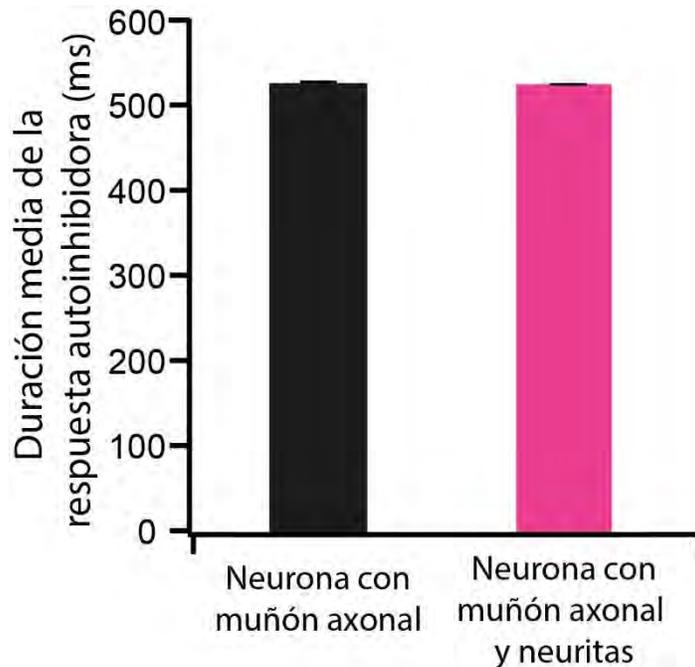


Figura 16. Promedio de la duración media de la respuesta de autoinhibición en neuronas en cultivo con muñón axonal. No hay diferencia significativa entre los grupos sin neuritas (14 neuronas; barra negra) y con neuritas (n= 21 neuronas; barra rosa). $P=0.835$.

La presencia de la respuesta de autoinhibición en neuronas Retzius con muñón axonal en cultivo, en donde se forman terminales presinápticas cerca del soma, pero no en somas aislados ni en neuronas *in situ*, muestra que la respuesta de autoinhibición sólo se encuentra en sitios donde la maquinaria sináptica está formada y no en sitios extrasinápticos como el soma o el axón primario.

Debido a que la amplitud y duración media de la respuesta de autoinhibición no son significativamente diferentes en las neuronas que fueron aisladas conservando un segmento del axón primario y que en cultivo no regeneraron neuritas con respecto a las que si regeneraron neuritas, en los experimentos posteriores se utilizaron neuronas con muñón axonal que presentaron la respuesta de autoinhibición, sin considerar la presencia o ausencia de neuritas.

7.2. Participación de las vesículas electrodensas perisinápticas en el fenómeno de autoinhibición

Los experimentos anteriores muestran que la respuesta de autoinhibición está localizada específicamente en las terminales presinápticas. Como ya se mencionó, estas se componen de dos pozas de vesículas claras: una adosada a la membrana, y una de reserva, así como de una poza de vesículas electrodensas que rodea a las anteriores y que libera su contenido en los alrededores de la terminal presináptica. No se conoce si la liberación de serotonina a partir de estas vesículas electrodensas participa en el mecanismo de autoinhibición en la terminal.

Para estudiar si la serotonina liberada por vesículas electrodensas de la zona perisináptica participa en la activación del mecanismo de autoinhibición, bloqueamos los canales de calcio tipo L, que se requieren para producir liberación extrasináptica, pero no sináptica (Trueta y De-Miguel, en preparación; Reuter 1996). Para ello incubamos a las neuronas con nimodipina 10 μ M.

Las neuronas fueron estimuladas con un tren de 10 impulsos a 10 Hz antes de añadir nimodipina 10 μ M en el baño. Este registro fue considerado como control y en la Figura 17 se muestra como el minuto 0 de incubación. Después de añadir nimodipina en el baño, se estimuló a las neuronas con un tren a 10 Hz cada 5 minutos por 20 minutos.

Después de 20 minutos en presencia de la nimodipina, las células mostraron una disminución en la amplitud de la respuesta de autoinhibición (Figura 17 A) que en promedio fue de 57.8% de la respuesta inicial (Figura 17B). Esto sugiere que la liberación de serotonina a partir de vesículas electrodensas perisinápticas sí contribuye a la activación del mecanismo de autoinhibición en las terminales.

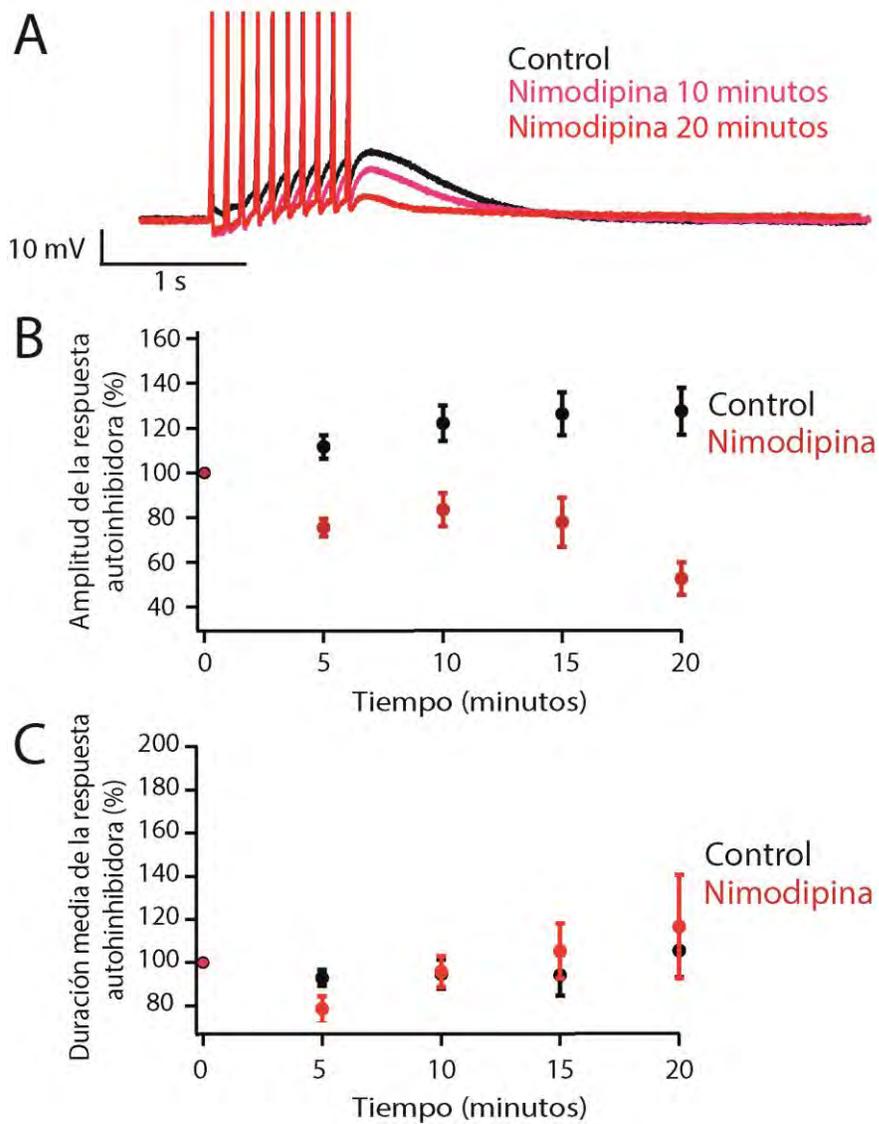


Figura 17. El bloqueo de los canales de calcio tipo L disminuyó la amplitud pero no afectó la cinética del mecanismo de autoinhibición. A) Registros representativos de neuronas de Retzius en cultivo estimuladas con un tren de 10 impulsos a 10 Hz, antes (control, trazos negros) y después de incubar con nimodipina 10 μ M (trazos rojos y rosas). Los potenciales de acción se muestran truncados. B) **Porcentaje de la amplitud máxima de la respuesta autoinhibidora inicial** en función del tiempo en ausencia y presencia de nimodipina. El bloqueo de los canales de calcio tipo L disminuyó la amplitud de la respuesta autoinhibidora de manera dependiente del tiempo. C) **Duración media de la respuesta autoinhibidora en función del tiempo expresada como porcentaje de su valor inicial.** El bloqueo de los canales de calcio tipo L no afectó la duración media de la respuesta. Se muestra el promedio y el error estándar del registro de 6 neuronas.

Para corroborar que la disminución de la amplitud de la respuesta de autoinhibición estaba siendo producida sólo por el efecto de la nimodipina y no debido a un deterioro de las neuronas como consecuencia de mantener el electrodo dentro de éstas durante todo el registro y las constantes estimulaciones, se realizaron registros control, estimulando cada 5 minutos células en ausencia de nimodipina o en presencia de etanol 0.0001 %, el vehículo donde se disolvió la nimodipina. Además, se registró un grupo de neuronas que fue incubado con nimodipina y al cual sólo se estimuló con un tren de 10 impulsos a 10 Hz antes de aplicar la nimodipina y otro tren 20 minutos después de haber añadido el fármaco. Tanto en los registros en ausencia de nimodipina como en aquellos en presencia del vehículo no solamente no ocurrió una disminución de la respuesta postpotencial, sino que la amplitud de ésta se incrementó en un 30 % con respecto a la amplitud inicial (Figura 17B), debido posiblemente a que a lo largo del registro se selló la membrana plasmática alrededor del electrodo, incrementando la resistencia de entrada. En las neuronas que fueron incubadas con nimodipina, la amplitud de la respuesta de autoinhibición disminuyó en promedio un 63 % a los 20 minutos de haber incubado con el fármaco, (Figura 18), de manera similar a las neuronas que fueron estimuladas cada 5 minutos (Figura 17). Estos resultados comprueban que la disminución en la amplitud de la respuesta de autoinhibición observada en el grupo tratado con nimodipina fue el efecto del bloqueo de los canales de calcio tipo L por la incubación con nimodipina, y no se debe al deterioro de la actividad eléctrica de las neuronas a lo largo del registro. La disminución de la respuesta de autoinhibición por el bloqueo de los canales de calcio tipo L sugiere que la serotonina de las vesículas electrodensas de la zona perisináptica sí participa en la activación del mecanismo de autoinhibición.

Por otro lado, la duración media de la respuesta de autoinhibición a lo largo de los 20 minutos que duró el registro no fue diferente en los grupos que se describieron en esta sección (Figura 17C), lo que sugiere el bloqueo de los canales de calcio tipo L, sólo afectó la cantidad de serotonina liberada por vesículas perisinápticas y no la cinética del mecanismo de autoinhibición.

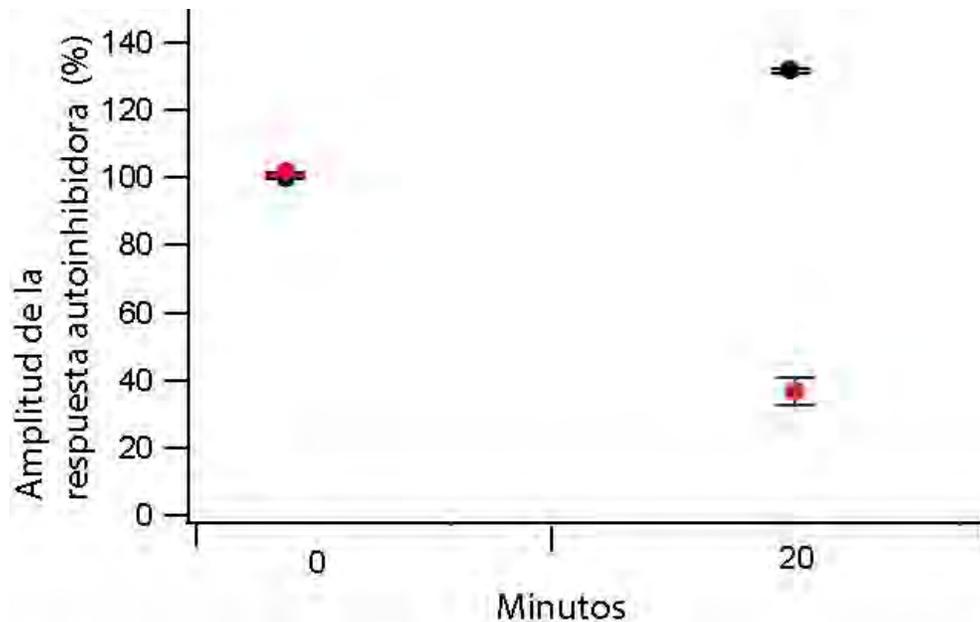


Figura 18. La disminución de la respuesta de autoinhibición es efecto del fármaco y no de la estimulación repetitiva.

Promedio de la amplitud máxima de la respuesta de autoinhibición. Las neuronas fueron estimuladas con un tren de 10 impulsos a 10 Hz antes y 20 minutos después sin incubarse con nimodipina (puntos negros) o incubando con nimodipina 10 µM (puntos rojos) n= 6.

Además de presentarse después de trenes de estimulación a altas frecuencias, la respuesta de autoinhibición se presenta después de un solo potencial de acción o de trenes a 1 Hz, que sabemos producen sólo liberación a partir de vesículas claras en la terminal presináptica (Trueta y De-Miguel, en preparación). En otras preparaciones bien estudiadas, esta liberación depende de la entrada de calcio a la terminal a través de canales de calcio tipo N, ó P/Q por lo que el bloqueo de los canales de calcio tipo L no debería afectar la liberación de serotonina de las vesículas claras. Para comprobar que la nimodipina no estaba afectando la liberación de serotonina a partir de vesículas claras, se analizaron los registros de neuronas en cultivo donde la respuesta de autoinhibición era claramente

observada después de cada potencial de acción durante trenes a 1 Hz, antes y después de haber incubado con nimodipina durante 20 minutos. En las neuronas de Retzius que fueron aisladas conservando un segmento del axón primario (muñón axonal) se observó una despolarización de 3.65 ± 1.44 mV después de cada potencial de acción cuando se estimularon con trenes de 10 impulsos a 1 Hz. La amplitud de las respuestas de autoinhibición a esta frecuencia no fue afectada por la incubación con nimodipina, lo que muestra que el bloqueo de los canales de calcio tipo L sólo inhibe la liberación de serotonina a partir de vesículas electrodensas (Figura 19).

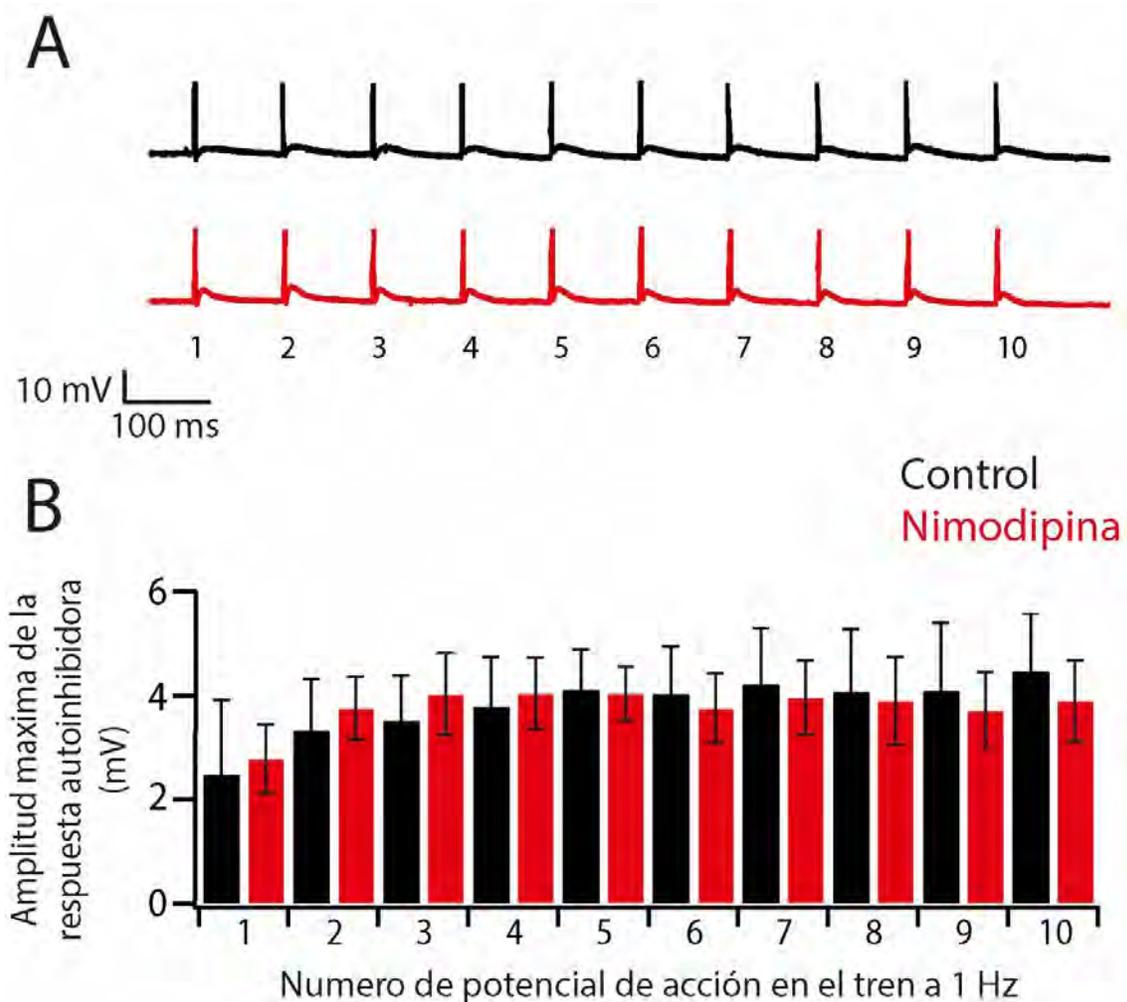


Figura 19. El bloqueo de los canales de calcio tipo L no afectó la liberación sináptica. A) Registros representativos de una neurona de Retzius en cultivo estimulada con un tren de 10 impulsos a 1 Hz, frecuencia que evoca liberación sináptica pero no extrasináptica. El trazo negro muestra el registro control y el rojo muestra el registro 20 minutos después de haber añadido nimodipina. Los potenciales de acción se muestran truncados. B) Promedio de la amplitud de la respuesta de autoinhibición después de cada potencial de acción del tren a 1 Hz en condiciones control (barras negras) y después de 20 minutos de incubación con nimodipina (barras rojas). El bloqueo de los canales de calcio tipo L no afectó la amplitud de la respuesta autoinhibidora a esta frecuencia. n=6.

8. Discusión

En este trabajo mostramos que el mecanismo de autoinhibición mediado por corrientes de cloro en neuronas de Retzius de la sanguijuela se localiza de manera específica en las terminales presinápticas, y que la serotonina liberada por las vesículas electrodensas que se encuentran en la zona perisináptica participa también en la activación del mecanismo de autoinhibición en la terminal.

El registro de neuronas de Retzius en diferentes condiciones experimentales permitió estudiar el mecanismo de autoinhibición en los diferentes compartimientos de una misma neurona y así determinar que este se encuentra de exclusivamente en las terminales presinápticas. Este mecanismo se describió en neuronas en cultivo que fueron aisladas conservando un segmento del axón primario (Cercós et al., 2009), donde se forman terminales presinápticas cercanas al soma. En nuestros experimentos se registró la respuesta de autoinhibición, invertida y amplificada, como una despolarización después del tren de estimulación, confirmando que las neuronas en cultivo que conservan un segmento del axón presentan el mecanismo de autoinhibición. El registro de somas aislados del axón permitió estudiar la posible presencia de la respuesta de autoinhibición en el soma, aislándolo de los demás compartimientos funcionales. A pesar de que las neuronas de Retzius secretan serotonina por el soma, en estas condiciones no se registró la respuesta de autoinhibición después de trenes de impulsos, lo cual muestra de manera inequívoca que el mecanismo de autoinhibición no se lleva a cabo en este compartimiento funcional. En el soma la serotonina está almacenada en vesículas electrodensas, y no existen terminales presinápticas, sino que toda la secreción es extrasináptica por lo cual, la ausencia del mecanismo de autoinhibición en este compartimento sugiere que éste se encuentra específicamente en sitios de secreción sinápticos.

En neuronas *in situ* registradas dentro de los ganglios nerviosos tampoco se observó la respuesta de autoinhibición, a pesar de que dentro del ganglio las neuronas de Retzius presentan terminales presinápticas. Estas terminales se

encuentran en las puntas de los axones en el neuropilo y están electrotónicamente alejadas del soma (Leake 1986), por lo que la propagación pasiva atenúa las respuestas, impidiendo que lleguen al soma. A diferencia de lo que ocurre en el ganglio, las neuronas en cultivo conservan un muñón axonal, en cuya punta se pueden formar terminales presinápticas. Dado que la punta del muñón axonal se encuentra muy cercana al soma, en estas condiciones los registros en el soma reflejan de manera fiel los eventos eléctricos que ocurren en las terminales y por ello las respuestas de autoinhibición se pueden registrar con un microelectrodo en el soma de neuronas en cultivo con muñón axonal.

El axón primario de las neuronas de Retzius presenta también secreción extrasináptica, cuyas características son intermedias entre las de la secreción sináptica y la secreción somática (Cercós et al., en preparación). El hecho de no registrar respuestas de autoinhibición en el soma de neuronas *in situ* muestra también que el mecanismo de autoinhibición no se encuentra tampoco en el axón primario de la neurona en condiciones fisiológicas. De encontrarse en esta región, las respuestas de autoinhibición generadas en el axón primario sí se propagarían hasta el soma y sería posible observarlas en estos registros.

Registrar la respuesta de autoinhibición en neuronas en cultivo que fueron aisladas conservando un segmento de axón primario, y no en somas aislados sin muñón axonal ni en neuronas *in situ* dentro del ganglio mostró que el mecanismo de autoinhibición se localiza específicamente en las terminales presinápticas.

En los registros de neuronas en cultivo que conservaron un segmento del axón primario no hubo diferencia significativa si las neuronas regeneraron neuritas o no, ya que las terminales presinápticas se forman independientemente de la aparición de neuritas.

Además se conoce que las neuronas serotoninérgicas tienen un periodo de inhibición después de la estimulación a altas frecuencias (Gocht y Heinrich 2007), que en neuronas del rafe es producido por la serotonina liberada (Cunningham y Lakoski 1988). En neuronas serotoninérgicas del caracol (Heinrich et al., 1999) y en

las neuronas de Retzius de la sanguijuela (Carretta 1988) se ha descrito un mecanismo de autoinhibición que se atribuye a las propiedades intrínsecas de la membrana celular, sin embargo, el mecanismo de autoinhibición mediado por corrientes de cloro, cuya localización estudiamos en este trabajo, es distinto de los anteriormente mencionados (Cercos, De-Miguel, y Trueta 2009). El mecanismo de autoinhibición mediado por corrientes de cloro, ocurre inmediatamente después de la estimulación a altas frecuencias pero también después de un solo potencial de acción, mientras que la inhibición post activación en neuronas serotoninérgicas en los núcleo del rafe (Cunningham y Lakoski 1988) y en neuronas serotoninérgicas del caracol (Heinrich et al., 1999) ocurre sólo ante estímulos a frecuencias altas.

La inhibición descrita en neuronas de Retzius de sanguijuela por Carretta, 1988, fue estudiada *in situ* dentro del ganglio nervioso, donde no fue posible registrar el mecanismo que estudiamos en este trabajo. En ese estudio se realizaron registros en donde se estimularon las neuronas en condiciones fisiológicas, es decir, registrándolas con KAc en el electrodo con pulsos largos que fuerzan a las neuronas a disparar; en estas condiciones no es posible registrar el mecanismo de autoinhibición que estudiamos en este trabajo (Cercos, De-Miguel, y Trueta 2009), lo que sugiere que aquellos trabajos describen un mecanismo de autoinhibición que ocurre en un compartimento funcional diferente a las terminales nerviosas.

Los resultados de este proyecto indican que el mecanismo de autoinhibición mediado por corrientes de cloro, sólo se encuentra en las terminales presinápticas, lo cual concuerda con el modelo matemático que simula el mecanismo de autoinhibición mediado por corrientes de cloro de estas neuronas (Cercos, De-Miguel, y Trueta 2009). El modelo está basado en evidencias experimentales, electrofisiológicas y morfológicas y muestra que los potenciales de acción producidos por la estimulación eléctrica en el soma de las neuronas *in situ* sufren una disminución en su amplitud al llegar a las terminales presinápticas en la punta de los axones o en las ramificaciones debido a la autoinhibición activada por la serotonina liberada en respuesta a los potenciales de acción precedentes, mientras que la disminución de los potenciales de acción no ocurre si se modifican

los parámetros del modelo, de tal forma que no se consideran las terminales presinápticas, por lo que es una forma en que las neuronas regulan la secreción de neurotransmisor y la actividad eléctrica de manera compartimentalizada.

En estas neuronas, como en otras, las terminales presinápticas contienen dos tipos de vesículas: vesículas claras, responsables de la liberación sináptica y vesículas electrodensas, que liberan su contenido en la periferia de las terminales presinápticas, sin embargo, parte de esta serotonina difunde hacia la terminal contribuyendo a la comunicación sináptica. Estimular a las neuronas con trenes de 10 impulsos a 10 Hz permitió evocar liberación sináptica a partir de vesículas claras y también liberación perisináptica a partir de vesículas electrodensas (De-Miguel y Trueta 2005), lo que hacía posible que la serotonina liberada a partir de vesículas electrodensas estuviera participando en la activación del mecanismo de autoinhibición.

La liberación extrasináptica a partir de vesículas electrodensas es dependiente de la entrada de calcio por los canales de calcio tipo L (Trueta et al., 2003; Trueta y De-Miguel, en preparación). Estos canales no participan en la liberación sináptica a partir de vesículas claras (Reuter 1996), por lo cual bloquear los canales de calcio tipo L incubando a las neuronas con nimodipina 10 μM nos permitió bloquear selectivamente la liberación de serotonina a partir de vesículas electrodensas de la zona perisináptica y de esta forma investigar si este componente contribuía de manera significativa en la activación del mecanismo de autoinhibición que se produce en las terminales presinápticas.

El bloqueo de los canales de calcio tipo L disminuyó la amplitud de la respuesta de autoinhibición de manera dependiente del tiempo, lo que indica que la nimodipina disminuyó la cantidad de serotonina liberada por la neurona, y sugiere que la serotonina liberada por vesículas electrodensas de la zona perisináptica sí participa en el mecanismo de autoinhibición. La nimodipina no tuvo efecto sobre la cinética del mecanismo, lo que sugiere que los canales tipo L no participan en el mecanismo activado por la serotonina ni en el tiempo que tarda la serotonina en difundir y actuar sobre los autoreceptores. Nuestros resultados muestran que la

serotonina liberada a partir de vesículas electrodensas participa en la activación del mecanismo de autoinhibición en las terminales presinápticas.

La cinética de una respuesta contiene información sobre la distancia entre los sitios de liberación y los receptores que producen dicha respuesta. Por ello, el hecho de que la cinética no se alterara al bloquear la liberación a partir de vesículas electrodensas podría sugerir que los autoreceptores se localizan en la zona periférica de la terminal presináptica cerca de la zona de liberación perisináptica, de manera que el tiempo que tarda a la serotonina en llegar a ellos sería independiente del tipo de vesícula que la secreta. Sin embargo, es posible que la larga duración de la respuesta por sí misma haga que el tiempo de difusión de la serotonina desde un sitio de liberación u otro no afecte significativamente la cinética, imposibilitando conocer la localización precisa de los autorreceptores a través de éste parámetro.

Bloquear los canales de calcio tipo L no afectó la liberación sináptica a partir de vesículas claras, ya que en neuronas que fueron estimuladas con un tren de 10 impulsos a 1 Hz, que sabemos sólo produce liberación de serotonina a partir de vesículas claras (Trueta y De-Miguel, en preparación), la nimodipina no disminuyó la amplitud de la respuesta de autoinhibición.

La secreción de serotonina en la zona activa proveniente de las vesículas claras se facilita a 5 Hz y se deprime a frecuencias mas altas, mientras que la liberación perisináptica a partir de vesículas electrodensas que rodean a las claras se activa a partir de la estimulación a 2 Hz pero requiere de frecuencias de 20 Hz o mayores para alcanzar su liberación máxima (Trueta, et al., en preparación). Debemos recordar que a pesar de que en los experimentos la respuesta de autoinhibición se ve como una despolarización, en condiciones fisiológicas es una hiperpolarización y una disminución en la resistencia de entrada que producen una disminución de la excitabilidad, por lo que podemos afirmar que la estimulación a bajas frecuencias libera menor cantidad de serotonina pero la autoinhibición es menor también, mientras que la estimulación a altas frecuencias provoca mayor secreción de serotonina pero esto produce mayor autoinhibición, reduciendo la

frecuencia de disparo de la neurona, lo cual sugiere que el mecanismo de autoinhibición mediado por corrientes de cloro puede estar regulando la secreción de la neurona provocando que se desplace hacia la frecuencia de liberación máxima, y manteniendo así la secreción en una frecuencia de máxima eficiencia.

Cabe resaltar que en el mecanismo de autoinhibición que estudiamos en este trabajo no se conocen cuáles son los autoreceptores a los que se une la serotonina, que se sabe están acoplados a canales de cloro. En neuronas sensoriales sensibles a presión de la sanguijuela se ha descrito un receptor a serotonina que produce una corriente de cloro, el cual está acoplado a la proteína cinasa A y no es sensible a los antagonistas para receptores serotoninérgicos utilizados en mamíferos, (Sanchez-Armass, Merz, y Drapeau 1991). Es posible que este mismo receptor sea el que media este mecanismo de autoinhibición; sin embargo, esto es algo que debe ser investigado con mayor detalle.

La serotonina es secretada de distintos compartimientos funcionales en una misma neurona (soma, axón, terminales presinápticas) y la secreción a partir de cada compartimiento tiene características distintas y produce efectos diferentes. La demostración de que un mecanismo de autorregulación se localiza específicamente en uno de estos compartimientos apoya la idea de que la regulación de la secreción es diferente en cada compartimiento. Conocer la localización específica de los mecanismos que regulan la secreción así como la contribución de las pozas vesiculares a los mismos, contribuye al conocimiento general de los sistemas serotoninérgicos, por lo que identificar si el mecanismo de autoinhibición mediado por corrientes de cloro descrito en neuronas de Retzius se localiza exclusivamente en las terminales presinápticas, contribuye a conocer los mecanismos finos de regulación de la secreción mediados por una misma neurona en cada compartimiento funcional.

La localización específica de este mecanismo puede ser utilizada como herramienta para el estudio de otros mecanismos en las terminales presinápticas y utilizada como modelo para diferenciar de manera indirecta, la secreción proveniente de las terminales presinápticas y de sitios extrasinápticos.

9. Conclusiones

El mecanismo de autoinhibición mediado por corrientes de cloro está localizado exclusivamente en las terminales presinápticas, y no en el soma ni en sitios de liberación extrasináptica del axón primario.

La serotonina liberada por vesículas electrodensas en la zona perisináptica participa en la autoinhibición en las terminales.

Referencias

- Aghajanian, G. K., J. S. Sprouse, P. Sheldon, y K. Rasmussen. 1990. «Electrophysiology of the Central Serotonin System: Receptor Subtypes and Transducer Mechanisms». *Annals of the New York Academy of Sciences* 600: 93-103; discussion 103.
- Aghajanian, G. K., y C. P. Vandermaelen. 1982. «Intracellular Identification of Central Noradrenergic and Serotonergic Neurons by a New Double Labeling Procedure». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 2 (12): 1786-92.
- Aghajanian, G. K., y C. P. Vandermaelen. 1982. «Alpha 2-Adrenoceptor-Mediated Hyperpolarization of Locus Coeruleus Neurons: Intracellular Studies in Vivo». *Science* 215 (4538): 1394-96. doi:10.1126/science.6278591.
- Agnati, L. F., K. Fuxe, M. Zoli, I. Ozini, G. Toffano, y F. Ferraguti. 1986. «A Correlation Analysis of the Regional Distribution of Central Enkephalin and Beta-Endorphin Immunoreactive Terminals and of Opiate Receptors in Adult and Old Male Rats. Evidence for the Existence of Two Main Types of Communication in the Central Nervous System: The Volume Transmission and the Wiring Transmission». *Acta Physiologica Scandinavica* 128 (2): 201-7. doi:10.1111/j.1748-1716.1986.tb07967.x.
- Barnes, Ruppert, E. E., y Litvaitis, M. K. 1968. *Invertebrate zoology*. Philadelphia: WB Saunders.
- Blackshaw, S. E., y J. G. Nicholls. 1995. «Neurobiology and Development of the Leech». *Journal of Neurobiology* 27 (3): 267-76. doi:10.1002/neu.480270302.
- Broduehrer, Peter D., y Maria Stella E. Thorogood. 2001. «Identified neurons and leech swimming behavior». *Progress in Neurobiology* 63 (4): 371-81. doi:10.1016/S0301-0082(00)00048-4.
- Brown, C. H. 2004. «Rhythmogenesis in Vasopressin Cells». *Journal of Neuroendocrinology* 16 (9): 727-39. doi:10.1111/j.1365-2826.2004.01227.x.
- Carretta, M. 1988. «The Retzius Cells in the Leech: A Review of Their Properties and Synaptic Connections». *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology* 91 (3): 405-13.
- Cercos, M. G., F. F. De-Miguel, y C. Trueta. 2009. «Real-Time Measurements of Synaptic Autoinhibition Produced by Serotonin Release in Cultured Leech Neurons». *Journal of Neurophysiology* 102 (2): 1075-85. doi:10.1152/jn.00107.2009.

- Cercós, Montserrat G., Francisco F. De-Miguel, y Citlali Trueta. 2009. «Real-Time Measurements of Synaptic Autoinhibition Produced by Serotonin Release in Cultured Leech Neurons». *Journal of Neurophysiology* 102 (2): 1075-85. doi:10.1152/jn.00107.2009.
- Chaput, Y., P. Blier, y C. de Montigny. 1986. «In Vivo Electrophysiological Evidence for the Regulatory Role of Autoreceptors on Serotonergic Terminals». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 6 (10): 2796-2801.
- Cheramy, A., V. Leviel, y J. Glowinski. 1981. «Dendritic Release of Dopamine in the Substantia Nigra». *Nature* 289 (5798): 537-43. doi:10.1038/289537a0.
- Citlali Trueta, Bruno Méndez. 2003. «Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurones.» *The Journal of physiology* 547 (Pt 2): 405-16. doi:10.1113/jphysiol.2002.030684.
- Coggeshall, R. E., y D. W. Fawcett. 1964. «THE FINE STRUCTURE OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF THE LEECH, HIRUDO MEDICINALIS». *Journal of Neurophysiology* 27 (marzo): 229-89.
- Cunningham, K. A., y J. M. Lakoski. 1988. «Electrophysiological Effects of Cocaine and Procaine on Dorsal Raphe Serotonin Neurons». *European Journal of Pharmacology* 148 (3): 457-62.
- Dahlstroem, A., y K. Fuxe. 1964. «EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS». *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, SUPPL 232:1-55.
- De-Miguel, Francisco F., y Citlali Trueta. 2005. «Synaptic and Extrasynaptic Secretion of Serotonin». *Cellular and Molecular Neurobiology* 25 (2): 297-312.
- Fornal, C. A., W. J. Litto, C. W. Metzler, F. Marrosu, K. Tada, y B. L. Jacobs. 1994. «Single-Unit Responses of Serotonergic Dorsal Raphe Neurons to 5-HT_{1A} Agonist and Antagonist Drug Administration in Behaving Cats». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270 (3): 1345-58.
- Fuchs, P. A., J. G. Nicholls, y D. F. Ready. 1981. «Membrane Properties and Selective Connexions of Identified Leech Neurones in Culture». *The Journal of Physiology* 316 (julio): 203-23.
- Gerhardt, C. C., y H. van Heerikhuizen. 1997. «Functional Characteristics of Heterologously Expressed 5-HT Receptors». *European Journal of Pharmacology* 334 (1): 1-23.

- Gocht, Daniela, y Ralf Heinrich. 2007. «Postactivation Inhibition of Spontaneously Active Neurosecretory Neurons in the Medicinal Leech». *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 193 (3): 347-61. doi:10.1007/s00359-006-0190-x.
- Grace, A. A., y B. S. Bunney. 1984. «The Control of Firing Pattern in Nigral Dopamine Neurons: Burst Firing». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 4 (11): 2877-90.
- Heinrich, R., S. I. Cromarty, M. Hörner, D. H. Edwards, y E. A. Kravitz. 1999. «Autoinhibition of Serotonin Cells: An Intrinsic Regulatory Mechanism Sensitive to the Pattern of Usage of the Cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5): 2473-78.
- Henderson, L P. 1983. «The role of 5-hydroxytryptamine as a transmitter between identified leech neurones in culture.» *The Journal of Physiology* 339 (junio): 309-24.
- Hornung, Jean-Pierre. 2004. «The human raphe nuclei and the serotonergic system». *Journal of chemical neuroanatomy* 26 (4): 331-43. doi:10.1016/j.jchemneu.2003.10.002.
- Hull, E. M., D. S. Lorrain, J. Du, L. Matuszewich, L. A. Lumley, S. K. Putnam, y J. Moses. 1999. «Hormone-Neurotransmitter Interactions in the Control of Sexual Behavior». *Behavioural Brain Research* 105 (1): 105-16.
- Jacobs, B. L., y E. C. Azmitia. 1992. «Structure and Function of the Brain Serotonin System». *Physiological Reviews* 72 (1): 165-229.
- Jacobs, B. L., y C. A. Fornal. 1993. «5-HT and Motor Control: A Hypothesis». *Trends in Neurosciences* 16 (9): 346-52.
- Katz, B., y R. Miledi. 1970. «Membrane Noise Produced by Acetylcholine». *Nature* 226 (5249): 962-63.
- Kita, T., H. Kita, y S. T. Kitai. 1986. «Electrical membrane properties of rat substantia nigra compacta neurons in an in vitro slice preparation». *Brain Research* 372 (1): 21-30. doi:10.1016/0006-8993(86)91454-X.
- Kuffler, Damien P., John Nicholls, y Pierre Drapeau. 1987. «Transmitter Localization and Vesicle Turnover at a Serotonergic Synapse between Identified Leech Neurons in Culture». *The Journal of Comparative Neurology* 256 (4): 516-26. doi:10.1002/cne.902560404.
- Lauder, J. M., y H. Krebs. 1978. «Serotonin as a Differentiation Signal in Early Neurogenesis». *Developmental Neuroscience* 1 (1): 15-30.

- Leake, L. D. 1986. «Leech Retzius Cells and 5-Hydroxytryptamine». *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology* 83 (2): 229-39.
- Lent, C. M. 1973. «Retzius Cells: Neuroeffectors Controlling Mucus Release by the Leech». *Science (New York, N.Y.)* 179 (4074): 693-96.
- Lent, C. M., y M. H. Dickinson. 1987. «On the Termination of Ingestive Behaviour by the Medicinal Leech». *The Journal of Experimental Biology* 131 (septiembre): 1-15.
- Lent, C. M., y B. M. Frazer. 1977. «Connectivity of the Monoamine-Containing Neurons in Central Nervous System of Leech». *Nature* 266 (5605): 844-47. doi:10.1038/266844a0.
- Leon-Pinzon, Carolina, Montserrat G. Cercós, Paula Noguez, Citlali Trueta, y Francisco F. De-Miguel. 2014. «Exocytosis of Serotonin from the Neuronal Soma Is Sustained by a Serotonin and Calcium-Dependent Feedback Loop». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 169. doi:10.3389/fncel.2014.00169.
- Lessmann, V., y I. D. Dietzel. 1991. «Development of Serotonin-Induced Ion Currents in Identified Embryonic Retzius Cells from the Medicinal Leech (*Hirudo Medicinalis*)». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 11 (3): 800-809.
- Lüllmann, Heinz, Klaus Mohr, y Lutz Hein. 2010. *Farmacología: texto y atlas*. Ed. Médica Panamericana.
- Mansvelder, H. D., y K. S. Kits. 2000. «Calcium Channels and the Release of Large Dense Core Vesicles from Neuroendocrine Cells: Spatial Organization and Functional Coupling». *Progress in Neurobiology* 62 (4): 427-41.
- Mason, P. 1997. «Physiological Identification of Pontomedullary Serotonergic Neurons in the Rat». *Journal of Neurophysiology* 77 (3): 1087-98.
- Moeller, F. G., D. M. Dougherty, A. C. Swann, D. Collins, C. M. Davis, y D. R. Cherek. 1996. «Tryptophan Depletion and Aggressive Responding in Healthy Males». *Psychopharmacology* 126 (2): 97-103. doi:10.1007/BF02246343.
- Muller, Kenneth J. 1981. *Neurobiology of the Leech*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Nicholls, J. G., y D. A. Baylor. 1968. «Specific Modalities and Receptive Fields of Sensory Neurons in CNS of the Leech». *Journal of Neurophysiology* 31 (5): 740-56.

- Nicholls, John G., A. Robert Martin, Paul A. Fuchs, David A. Brown, Mathew E. Diamond, y David Weisblat. 2011. *From Neuron to Brain, Fifth Edition*. 5 edition. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Inc.
- Pérez, Lorenzo, Moreno González, Leza, Lizasoain Hernández, Moro Sánchez, Portolés, y Pedro Lorenzo Fernández. 2008. *Velázquez. Farmacología Básica y Clínica*. Ed. Médica Panamericana.
- Purves, Dale. 2007. *Neurociencia*. Editorial Medica Panamericana Sa de.
- Raleigh, M. J., M. T. McGuire, G. L. Brammer, D. B. Pollack, y A. Yuwiler. 1991. «Serotonergic Mechanisms Promote Dominance Acquisition in Adult Male Vervet Monkeys». *Brain Research* 559 (2): 181-90.
- Ready, D. F., y J. Nicholls. 1979. «Identified Neurones Isolated from Leech CNS Make Selective Connections in Culture». *Nature* 281 (5726): 67-69.
- Reuter, H. 1996. «Diversity and Function of Presynaptic Calcium Channels in the Brain». *Current Opinion in Neurobiology* 6 (3): 331-37.
- Rogawski, M. A., y G. K. Aghajanian. 1981. «Serotonin Autoreceptors on Dorsal Raphe Neurons: Structure-Activity Relationships of Tryptamine Analogs». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 1 (10): 1148-54.
- Ruddell, Richard G., Derek A. Mann, y Grant A. Ramm. 2008. «The function of serotonin within the liver». *Journal of Hepatology* 48 (4): 666-75. doi:10.1016/j.jhep.2008.01.006.
- Sanchez-Armass, S., D. C. Merz, y P. Drapeau. 1991. «Distinct Receptors, Second Messengers and Conductances Underlying the Dual Responses to Serotonin in an Identified Leech Neurone». *The Journal of Experimental Biology* 155 (enero): 531-47.
- Silverthorn, Dee Unglaub. 2008. *Fisiología Humana. Un enfoque integrado 4a edición*. Ed. Médica Panamericana.
- Steinbusch, H. W. 1984. «Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS».
- Tecott, Laurence H. 2007. «Serotonin and the Orchestration of Energy Balance». *Cell Metabolism* 6 (5): 352-61. doi:10.1016/j.cmet.2007.09.012.
- Törk, Istvan. 1990. «Anatomy of the Serotonergic Systema». *Annals of the New York Academy of Sciences* 600 (1): 9-34. doi:10.1111/j.1749-6632.1990.tb16870.x.

- Trueta, Citlali, y Francisco F. De-Miguel. 2012. «Extrasynaptic Exocytosis and Its Mechanisms: A Source of Molecules Mediating Volume Transmission in the Nervous System». *Frontiers in Physiology* 3: 319. doi:10.3389/fphys.2012.00319.
- Trueta, Citlali, Bruno Méndez, y Francisco F. De-Miguel. 2003a. «Somatic Exocytosis of Serotonin Mediated by L-Type Calcium Channels in Cultured Leech Neurones». *The Journal of Physiology* 547 (Pt 2): 405-16. doi:10.1113/jphysiol.2002.030684.
- . 2003b. «Somatic Exocytosis of Serotonin Mediated by L-Type Calcium Channels in Cultured Leech Neurones». *The Journal of Physiology* 547 (Pt 2): 405-16. doi:10.1113/jphysiol.2002.030684.
- Trueta, Citlali, Sergio Sánchez-Armass, Miguel A Morales, y Francisco F De-Miguel. 2004. «Calcium-induced calcium release contributes to somatic secretion of serotonin in leech Retzius neurons». *Journal of neurobiology* 61 (3): 309-16. doi:10.1002/neu.20055.
- Trulson, M. E., y T. Crisp. 1986. «Do Serotonin-Containing Dorsal Raphe Neurons Possess Autoreceptors?» *Experimental Brain Research* 62 (3): 579-86.
- Trulson, M. E., y C. J. Frederickson. 1987. «A Comparison of the Electrophysiological and Pharmacological Properties of Serotonin-Containing Neurons in the Nucleus Raphe Dorsalis, Raphe Medianus and Raphe Pallidus Recorded from Mouse Brain Slices in Vitro: Role of Autoreceptors». *Brain Research Bulletin* 18 (2): 179-90.
- Voderholzer, U., M. Hornyak, B. Thiel, C. Huwig-Poppe, A. Kiemen, A. König, J. Backhaus, D. Riemann, M. Berger, y F. Hohagen. 1998. «Impact of Experimentally Induced Serotonin Deficiency by Tryptophan Depletion on Sleep EEG in Healthy Subjects». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 18 (2): 112-24. doi:10.1016/S0893-133X(97)00094-8.
- Walther, Diego J., Jens-Uwe Peter, Saleh Bashammakh, Heide Hörtnagl, Mechthild Voits, Heidrun Fink, y Michael Bader. 2003. «Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform». *Science (New York, N.Y.)* 299 (5603): 76. doi:10.1126/science.1078197.
- Wang, R. Y., y G. K. Aghajanian. 1977. «Physiological Evidence for Habenula as Major Link between Forebrain and Midbrain Raphe». *Science (New York, N.Y.)* 197 (4298): 89-91.
- Yazdani, Neema, Constantine P. Firme, Eduardo R. Macagno, y Michael W. Baker. 2013. «Expression of a Dominant Negative Mutant Innexin in Identified Neurons and Glial Cells Reveals Selective Interactions among Gap

Junctional Proteins». *Developmental Neurobiology* 73 (8): 571-86.
doi:10.1002/dneu.22082.