

03062
2



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

**LOCALIZACION Y POSIBLES IMPLICACIONES
FUNCIONALES DE LAS VESICULAS DE NUCLEO
DENSO EN NEURONAS CULTIVADAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA**

P R E S E N T A

VICTOR HUGO HERNANDEZ GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO FERNANDEZ DE MIGUEL

MEXICO, D. F.

273596

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el laboratorio del Dr. Francisco Fernández de Miguel, a quien expreso mi profundo agradecimiento por su apoyo y valiosa asesoría.

El trabajo conjunto de asesoría y revisión de la tesis estuvo gentilmente realizado por los doctores Miguel Angel Morales Mendoza, Arturo Hernández Cruz, Julio Morán Andrade, Gabriel Gutiérrez Ospina y la Dra. Martha León.

Agradezco especialmente al Dr. Miguel Morales Mendoza por su especial y atento apoyo y comentarios al trabajo en general y en particular al relacionado con la microscopía electrónica.

El trabajo técnico para microscopía electrónica fue realizado por la Sra. Cleotilde Vargas.

El muy eficiente cuidado y mantenimiento de la colonia de sanguijuelas se debe a la Sra. Eloisa García.

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis tuve el apoyo de una beca por parte de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM.

LOCALIZACIÓN Y POSIBLES IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LAS VESÍCULAS DE NÚCLEO DENSO EN NEURONAS CULTIVADAS.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Morfología de las sinapsis	5
Mecanismos de liberación de transmisor y ciclo vesicular	7
Criterios para considerar una sustancia como transmisor	14
Cotransmisión	15
Formación de sinapsis en neuronas cultivadas	17
Hipótesis	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
I. Aislamiento y cultivo de células identificadas de sanguijuela <i>Hirudo medicinalis</i>	22
II. Identificación de terminales únicas con el colorante fluorescente FM1-43	23
- Tinción con el colorante FM1-43	23
- Microscopía de fluorescencia intensificada y captura de imágenes	24
- Microscopía confocal	25
- Conteo de terminales teñidas con FM1-43	25
III. Microscopía electrónica	27

RESULTADOS	28
I. Liberación diferencial de transmisor	30
- Distribución de los sitios de liberación	30
- Efecto de la formación de sinapsis sobre la distribución de las terminales	32
II. Análisis ultraestructural de las terminales sinápticas. Ciclo Vesicular	34
- Diferencias ultraestructurales entre el muñón y el soma Celular	34
- Características de las vesículas de núcleo denso	35
- Imágenes de endocitosis vesicular	36
- Posibles etapas en el ciclo de vida de las vesículas sinápticas. Cuerpos laminados	36
- Degradación de las terminales sinápticas: cuerpos multi-vesiculares	38
- Morfología nuclear	39
III. Posibles etapas en la formación de terminales sinápticas	40
- Morfología de las terminales sinápticas	41
- Evidencias de etapas previas a la formación de botones sinápticos	41
DISCUSIÓN	42
I. Liberación diferencial de transmisor entre el soma y el muñón	44
II. Ciclo vesicular	45
- Reciclamiento vesicular	45
- Degradación de las terminales sinápticas	48

III. Formación de terminales sinápticas a partir de cúmulos de vesículas preensamblados	49
---	----

CONCLUSIONES	53
---------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA	55
---------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

SNARE: receptor-aceptor soluble al factor sensible a la N-etilmaleimida.

vSNARE: SNARE vesicular.

tSNARE: SNARE de la membrana plasmática (t=target)

KR: Kiss and run.

CRPG: Péptido relacionado al gen de la calcitonina.

5-HT: Serotonina

CMV: Cuerpo multivesicular.

CL: Cuerpos laminados.

LOCALIZACIÓN Y POSIBLES IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LAS VESÍCULAS DE NÚCLEO DENSO EN NEURONAS CULTIVADAS

RESUMEN

En la sanguijuela, más del 50% de la 5-HT se encuentra localizada en las células de Retzius, tanto en vesículas claras, como de núcleo denso. En este trabajo estudiamos algunos de los aspectos asociados a la liberación de 5-HT en células de Retzius de sanguijuela en cultivo. En particular abordamos la pregunta de si la 5-HT puede liberarse desde sitios diferentes en la célula a partir de reservorios vesiculares diferentes. Adicionalmente estudiamos algunos de los posibles eventos asociados al reciclaje vesicular. Esto es importante porque implica que una misma sustancia, liberada por la misma neurona, pueda tener efectos diferentes sobre la función del animal y que su liberación este controlada por mecanismos distintos.

Utilizando el colorante fluorescente FM1-43, localizamos grupos vesiculares internalizados en neuronas de Retzius de sanguijuela en cultivo. En el soma, los sitios de endocitosis del colorante se encuentran en mayor cantidad en los planos profundos de la célula, cerca de los sitios de contacto con el sustrato, disminuyendo en densidad conforme se asciende hacia el polo superior. En el muñón, la cantidad de marca fluorescente es mucho menor que en el soma y su densidad disminuye progresivamente, desde su unión con el soma hasta desaparecer en la parte distal. Al sembrarlas en contacto muñón/soma y teñirlas, encontramos marca en la zona distal del muñón, en donde hacía contacto con el soma postsináptico. La marca sobre ambos somas continuó con las mismas características que en las células únicas. El análisis ultraestructural mostró que los botones sinápticos solo se localizan en la región del muñón, nunca en el soma. Por medio de

reconstrucciones de cortes seriados de microscopía electrónica, se apreció que en algunos casos, estas estructuras no tenían la morfología típica de un botón sináptico, sino que las vesículas no estaban en contacto con la membrana plasmática y que formaban una estructura esférica, en la cual la corteza contenía vesículas de núcleo denso y el centro vesículas claras. El soma, presentó una densidad mayor de vesículas de núcleo denso, comparadas con el muñón. En algunos casos fue posible encontrar vesículas de núcleo denso endocitándose. Existió una estrecha relación entre el núcleo celular y las vesículas de núcleo denso, algunas de ellas se encuentran incluso en contacto físico con el cariolema. Además, en el citoplasma, existen cuerpos multivesiculares (reconocidos como endosomas prelisosomales) con contenidos que van desde vesículas claras y/u oscuras hasta restos membranales y estructuras amorfas.

En conclusión, nosotros pensamos que una misma neurona puede tener mecanismos de liberación y almacenamiento diferentes para la misma molécula en sitios diferentes de ella, distribuyendo sus botones en el muñón y liberando el contenido de vesículas de núcleo denso de forma hormonal desde el soma. Estas vesículas podrían seguir 3 caminos: 1) reciclarse y reutilizarse reabasteciéndose de transmisor en los cuerpos laminados; 2) viajar hasta el núcleo o 3) degradarse de forma aislada o con todo el botón en los cuerpos multivesiculares. Como consecuencia de esto, la diferencia en las densidades de estas vesículas pudiera corresponder a diversas etapas en su ciclo en la célula.

Introducción

- **Morfología de las sinapsis**
 - **Mecanismos de liberación de transmisor y ciclo vesicular**
- **Criterios para considerar una sustancia como transmisor**
 - **Cotransmisión**
- **Formación de sinapsis en neuronas cultivadas**
 - **Hipótesis**

LOCALIZACIÓN Y POSIBLES IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LAS VESÍCULAS DE NÚCLEO DENSO EN NEURONAS CULTIVADAS.

INTRODUCCIÓN

Cuando los neurotransmisores son liberados desde la terminal presináptica, éstos pueden seguir dos caminos, alcanzar sitios adyacentes a ella o bien viajar por el espacio extracelular o incluso a la sangre, para actuar en puntos a veces muy distantes, como lo hacen las hormonas.

La liberación de los transmisores puede ser regulada por múltiples mecanismos, en los que influyen parámetros como la frecuencia de estimulación de la célula o el sitio donde se encuentran almacenados (Zimmerman, 1993). Esta regulación le confiere a la neurona una gran adaptabilidad a diversas circunstancias. Por lo tanto, es interesante saber si una sola neurona es capaz de liberar un mismo transmisor mediante mecanismos diferentes desde sitios diferentes de ella misma. Es decir, si el neurotransmisor puede liberarse de forma sináptica a partir de sitios especializados de la membrana y de forma hormonal en sitios diferentes a esos en la misma neurona. Confiriendo entonces efectos funcionales distintos a una misma molécula liberada por la misma neurona, pero bajo condiciones distintas. En nuestro trabajo abordamos este problema y analizamos diferentes mecanismos de liberación en neuronas identificadas de sanguijuela, en cultivo.

Por otro lado, el establecimiento de los contactos sinápticos correctos durante el desarrollo es vital para la sobrevivencia del individuo. Se conocen los eventos que sigue el desarrollo del sistema nervioso, pero poco sabemos de los mecanismos a nivel ultraestructural que sigue el ensamblaje de las terminales sinápticas en desarrollo. A partir de análisis

morfológicos, presentamos algunas evidencias acerca de los eventos que subyacen a la formación y degradación de un botón sináptico.

Para este estudio, las neuronas de Retzius en cultivo de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, ofrecen múltiples ventajas. El sistema nervioso central de la sanguijuela está constituido por 21 ganglios prácticamente idénticos. De ellos se pueden aislar neuronas identificadas y cultivarlas. Estas células conservan sus características de membrana y sintetizan los mismos canales, transmisores y receptores que en el ganglio. Además pueden crecer y formar conexiones sinápticas en cultivo (Ready y Nicholls, 1979). Esto ha permitido estudiar en detalle las etapas de la formación de sinapsis, los mecanismos de liberación de serotonina (5-HT) y la distribución de canales y receptores con una resolución que en otras preparaciones sería extraordinariamente difícil (Fernández de Miguel y Drapeu, 1995).

– Morfología de las sinapsis

Los puntos de contacto entre una neurona y otra donde se establece comunicación entre ambas células se denominan ***sinapsis***.

Bajo la microscopía de luz es poco lo que se puede apreciar de una sinapsis, de no ser algunas mitocondrias y una silueta en forma de bulbo o botón terminal que corresponde al axón presináptico unido a la superficie del componente postsináptico. Sin embargo, estos procedimientos no muestran nada acerca del resto de los organelos dentro del botón o el sitio de la interfase entre los componentes de la sinapsis. No fue sino hasta la aparición de la microscopía electrónica, en la década de los 50's, que se revelaron detalladamente las características de las sinapsis por grupos diferentes como el de De Robertis y Bennett en 1954 (Kuno, 1995). Robertson en invertebrados (1953) y Palade y Palay (1954) y Palay (1956) en vertebrados.

Funcionalmente existen dos tipos de sinapsis. La sinapsis **eléctrica**, en la cual la corriente generada por un impulso pasa a la siguiente neurona a través de canales de baja resistencia y la sinapsis **química**, en la que la comunicación está dada por mensajeros químicos. Estos mensajeros denominados *neurotransmisores*, son secretados desde uno de los componentes de la sinapsis y activan receptores en la membrana del otro componente. La sinapsis química es con mucho, la más común en el sistema nervioso central de los mamíferos adultos. Desde un punto de vista morfológico, las sinapsis químicas pueden describirse en función de sus componentes. Hay un componente **presináptico**, que se caracteriza por su contenido de vesículas sinápticas y por un grupo de mitocondrias. Este componente puede presentarse como un alargamiento o protrusión al final del axón, llamado **terminal presináptica** o como varicosidades a lo largo del axón, en cuyo caso se denomina **botón en passant** o **botón sináptico**. El segundo componente es la terminal **postsináptica**, cuya peculiaridad es que presenta una especialización en su membrana donde concentra canales y receptores, que serán el blanco del mensaje proveniente desde la terminal presináptica.

Entre ambas terminales, existe un espacio llamado **hendidura sináptica**, cuyas dimensiones son de aproximadamente 10 a 30 nm de ancho. Se ha observado que en el espacio de la hendidura existen filamentos a manera de puente entre las membranas pre y postsináptica, que probablemente sean laminina o agrina, los cuales pueden incluso continuarse con la densidad postsináptica y que probablemente sirvan para mantener unidas las dos membranas (Peters y Palay, 1996).

La membrana plasmática de las células que establecen el contacto pueden presentar una densidad que puede ubicarse en la membrana de ambas terminales, denominándose por esto sinapsis *simétrica* o bien sólo en la postsináptica, siendo entonces *asimétrica*. Estos son sitios especializados de la membrana, donde se acumulan una gran cantidad de proteínas, entre ellas canales, receptores y proteínas especializadas en el

mecanismo de secreción y se les denominan **zonas activas** en la terminal presináptica (Peters, Palay y Webster, 1991). La acumulación de vesículas ocurre precisamente en este punto de la terminal presináptica. Por su parte, la densidad postsináptica está compuesta de filamentos de actina y otras proteínas como fodrina, tubulina y proteínas cinasas. (Peters, Palay y Webster, 1991; Peters y Palay, 1996). Su papel fisiológico no está muy comprendido aún, pero se sabe que por ejemplo en la rana una misma placa neuromuscular puede tener variaciones estructurales que le confieren a cada sitio especializaciones fisiológicas particulares (Pawson, Grinnell y Wolowski, 1998, a y b).

Las vesículas de la terminal presináptica pueden ser de dos tipos. Las **claras**, tienen un diámetro aproximado de 40-50 nm y se encuentran aglomeradas cerca de la membrana plasmática de la terminal presináptica. Y las de **núcleo denso**, que son más grandes, de hasta 70-120 nm y habitualmente se localizan rodeando a las vesículas claras (Peters, Palay y Webster, 1991; Peters y Palay, 1996). Las vesículas sinápticas contienen al neurotransmisor, el cual se libera de las terminales en paquetes multimoleculares llamados cuantos. Por su parte, las vesículas de núcleo denso contienen además del neurotransmisor otras moléculas transmisoras conocidas como cotransmisores y suelen liberarse en sitios distintos, aunque cercanos, a las zonas activas (Zimmerman, 1993).

Un botón puede establecer contacto con cualquier superficie de otra neurona, por lo que la sinapsis puede recibir diversos nombres según el sitio de contacto: axodendrítica, axosomática, axoaxonal, dendrodendrítica, etc. (Peters, Palay y Webster, 1991; Peters y Palay, 1996).

– **Mecanismos de liberación de transmisor y ciclo vesicular.**

Al igual que otros tipos celulares, las neuronas poseen dos mecanismos principales de secreción: la *vía constitutiva* y la *vía regulada*. La vía constitutiva proporciona una secreción constante y está controlada

por la tasa de producción a partir de los organelos secretorios. Por otro lado, la vía regulada tiene lugar sólo cuando la célula es activada por alguna señal específica, por ejemplo la entrada de Ca^{2+} a la terminal. En esta vía participan las vesículas sinápticas, tanto las claras como las de núcleo denso. Mientras que la secreción por la vía constitutiva puede ocurrir en cualquier sitio de la neurona, la secreción regulada sucede únicamente en la zona activa.

En reposo, la terminal presináptica libera transmisor de manera espontánea (Fatt y Katz, 1952) desde las vesículas claras. Sin embargo, cuando se produce una despolarización, se abren los canales de calcio ubicados en la zona activa favoreciendo la fusión de la vesícula y la liberación de transmisor de manera sincrónica a partir de una o varias vesículas sinápticas (Katz y Miledi, 1967; 1968; Auger, Kondo y Marty, 1998).

La organización de las vesículas claras en la terminal sináptica, muestra que hay un grupo de ellas que se encuentra en contacto con la región presináptica de la zona activa, que tienen en consecuencia mayor probabilidad de fusionarse y liberar su contenido y que pertenecen por tanto a la poza de liberación inmediata. El otro grupo contiene a las vesículas de la poza de reserva que eventualmente, conforme las vesículas más cercanas a la membrana se vayan liberando, alcanzarán la zona activa y liberarán su contenido (Liu y Tsien, 1995; Pieribone y cols, 1995; Stevens y Tsujimoto, 1995; Rosenmund y Stevens, 1996).

En la región de la membrana celular que constituye la zona activa de la porción presináptica, existe una gran densidad de canales de calcio, los más importantes en el mecanismo de secreción son P y N (Llinás, Steinberg y Walton, 1981; Pumpilin, Reese y Llinás, 1981; Llinás y cols. 1989; Stanley, 1997; Reid, Bekkers y Clements, 1998). Cuando el potencial de acción arriba a la terminal presináptica, los canales sensibles al voltaje se abren y permiten la entrada de Ca^{2+} , esto desencadena una serie de interacciones proteicas que llevarán a la liberación del neurotransmisor.

Lo que conocemos actualmente acerca del ciclo vesicular, desde su actividad dentro de la terminal y la liberación del transmisor, hasta su endocitosis y reciclamiento, ha sido planteado a partir de las observaciones hechas en las vesículas claras, inicialmente en la placa neuromuscular (Heuser y Reese, 1973).

El contacto inicial entre las membranas vesicular y presináptica se conoce como *atracamiento* ("docking"). Una vez que se ha dado este atracamiento las vesículas deben pasar por un proceso de transformación en el cual se establece la primera interacción proteica. En este proceso se forma un complejo en el cual intervienen principalmente tres proteínas, dos que pertenecen a la membrana plasmática (syntaxina y SNAP-25) y una a la membrana vesicular (sinaptobrevina). A este primer complejo se le conoce como *complejo primario* (Südhoff, 1995). Este primer complejo forma el andamio sobre el cual se darán el resto de las interacciones que llevarán a la formación de un poro y la liberación del transmisor.

La siguiente interacción proteica es la formación del complejo SNARE (receptor-aceptor al factor sensible a la N-etilmaleimida), término que generaliza la serie de interacciones entre receptores proteicos tanto de la vesícula sináptica (v-SNARE) como de la membrana de la terminal presináptica (t-SNARE). Cuando esto ocurre la vesícula está lista para fusionarse y formar el poro, de tal manera que todos estos receptores pueden considerarse como reguladores de la cinética de liberación del neurotransmisor (Schweiser y cols. 1998). El disparador es el Ca^{2+} que ha entrado a través de los canales sensibles al voltaje de la zona activa. El Ca^{2+} entonces se pega a ciertos dominios de la sinaptotagmina, una proteína de la membrana vesicular, haciendo que ésta se acople a la syntaxina en la membrana plasmática. Esta asociación causa desacople del complejo haciendo que los fosfolípidos de las membranas vesicular y plasmática se fusionen y formen un poro. Este paso es dependiente de ATP y se considera la reacción limitante del proceso (Sollner y cols., 1993 a y b; Chapman, Hanson y Jahn, 1995; Südhof, 1995). Cuando esta estructura se

ha formado, las membranas de la vesícula y de la terminal forman una depresión en donde la unión íntima de ambas hace inestable la interacción entre las bicapas lipídicas favoreciendo su fusión y la formación del poro. La formación del poro sería espontánea debido a la tensión creada por las fuerzas atractivas a que están expuestas las membranas. Ya que la interacción es inestable, en esta etapa el poro puede estar en una fase sucesiva de aperturas y cierres, en donde puede ocurrir liberación parcial del transmisor (Álvarez de Toledo, Fernández-Chacón y Fernández, 1993; Neher, 1993). Si el poro se forma, la membrana se expande y libera su contenido (Fesce, Valtorta y Meldolesi, 1996; Monck y Fernández, 1996; Hanson y cols. 1997).

Las vesículas de núcleo denso, por su parte, no se secretan por las zonas activas, su cinética de liberación es más lenta que la de las vesículas claras. La maquinaria de fusión, liberación y reciclamiento puede ser la misma, que para las vesículas claras, sin embargo, poco se sabe acerca de la composición proteica de la membrana de las vesículas de núcleo denso, aunque se conoce que comparten algunos componentes de las vesículas claras, como la sinaptotagmina y las rab, aunque carecen de sinapsinas y de sinaptofisina (Thureson-Klein, 1983; Zhu, Thureson-Klein y Klein, 1986; Kagotani y cols, 1991; Weldon y cols. 1993; Winckler y Fischer-Colbrie, 1998).

Una vez que se ha fusionado la vesícula, la membrana es endocitada nuevamente. Este proceso puede ocurrir mediante dos mecanismos: endocitosis por vesículas con cubierta o endocitosis inmediatamente después del evento de la fusión vesicular, denominado "*kiss and run*" (Palfrey y Artalejo, 1998) (fig. 1).

En la endocitosis de vesículas con cubierta se necesita el ensamblaje de clatrina. Este ensamblaje se inicia con la interacción proteica de un receptor llamado AP-2 con la sinaptotagmina, de modo tal que la clatrina o la dinamina en ambos extremos de la vesícula a endocitar se unen y se forma una vesícula endocítica en cuya membrana se aprecia una cubierta

densa, la cubierta de clatrina. Las vesículas endocíticas avanzan hacia cisternas internas en la terminal, de donde posteriormente surgirán nuevas vesículas sinápticas (Heuser y Reese, 1973). De Camilli (1996) y Gad y colaboradores (1998) han propuesto un paso alternativo, donde mediante estudios morfológicos con microscopía electrónica de la unión neuromuscular después de estimular a la terminal a altas frecuencias, aparecen largas invaginaciones de la membrana plasmática de donde surgen las vesículas recubiertas, perdiéndola inmediatamente e integrándose a la terminal convirtiéndose en vesículas sinápticas. Sin embargo, esta última observación ha sido cuestionada por no realizarse en condiciones fisiológicas.

El calcio es importante en el proceso endocítico. Se sabe que el calcio actúa en la desfosforilación de la dinamina, paso clave para el inicio de la endocitosis (De Camilli y Greengard 1986).

Las vesículas recicladas acumulan neurotransmisor mediante gradiente electroquímico creado por una bomba de protones, de aquí las vesículas pasan por difusión o por transporte mediado por citoesqueleto a su sitio de almacenamiento. En las neuronas todo este ciclo puede tomar aproximadamente 1 minuto (Südhof, 1995; Bauerfeind, Galli y De camilli, 1996).

En el mecanismo llamado *kiss and run*, la vesícula se fija transitoriamente a la membrana plasmática, pero sus componentes lipídicos y/o proteicos no se mezclan con los de la membrana, sino que la vesícula se recaptura virtualmente intacta mediante un evento de endocitosis rápida, de manera que puede ser recargada de transmisor inmediatamente. Se ha podido demostrar que este proceso que ocurre después de la exocitosis, tiene una τ promedio de 0.3 ms (Palfrey y Artalejo, 1998). Como ocurre con la endocitosis de las vesículas de cubierta de clatrina, la dinamina también interviene aquí en el afrontamiento de los bordes de la vesícula y su desprendimiento de la membrana, por lo tanto esta endocitosis rápida es

también dependiente de Ca^{2+} . Además al sustituir este ion en el medio extracelular por Ba^{3+} o Sr^{2+} el fenómeno cesa (Guatimosim y cols., 1998).

Últimamente ha entrado en controversia la endocitosis mediada por cubierta de clatrina y el ciclo a través del cual las vesículas deben pasar por endosomas o cisternas para regresar a la terminal (Murthy y Stevens, 1998), ya que estas estructuras sólo se observan al estimular a la terminal con altas frecuencias, procedimientos distantes de las condiciones fisiológicas. Sin embargo, es probable que ambos fenómenos ocurran de manera paralela, de modo que bajo condiciones normales, la endocitosis rápida sea la que ocurra corrientemente y que en situaciones de sobreestimulación de la terminal aparezca el segundo mecanismo (Betz y Angleson, 1998).

Como ya se mencionó, desde el punto de vista funcional, hay dos grupos de vesículas claras en la terminal: las que forman la poza de reserva, que son las que se encuentran ancladas al citoesqueleto por una proteína llamada sinapsina I y las listas para liberarse. De esta manera, cuando las vesículas que forman la poza lista para liberarse son excitadas, las de reserva toman sus sitios, lo cual puede ser muy importante para procesos donde la transmisión sináptica debe ocurrir a altas frecuencias (Kuromi y Kidokoro, 1998). Para que esto suceda deben dissociarse del citoesqueleto. Esto ocurre cuando una calmodulina dependiente de Ca^{2+} se activa adquiriendo actividad enzimática fosforilando a la sinapsina I y liberando así a la vesícula de su anclaje, que puede entonces avanzar hacia la zona activa (De Camilli y Greengard, 1986) (fig. 1).

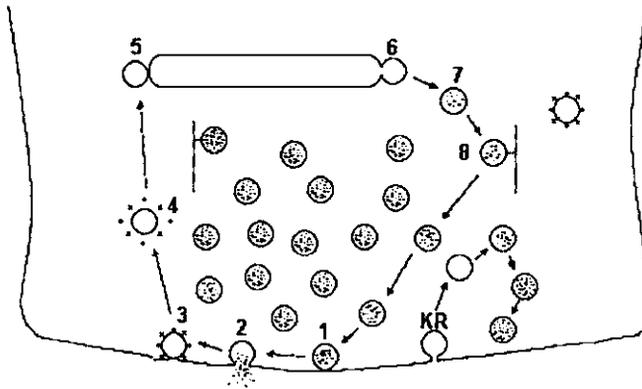


Fig.1. Ciclo de las vesículas claras en la terminal: (1) Las vesículas sufren un proceso de atracamiento en la membrana plasmática; (2) posteriormente se forma el poro de fusión y liberan su contenido; (3) después, una parte de la membrana plasmática se endocita y se cubre de una coraza proteica de clatrina; (4) ya en el citoplasma se despoja de esta cubierta y viaja hacia las cisternas (5); de ahí brota (6) para recargarse nuevamente de transmisor (7) y anclarse al citoesqueleto (8). Como un mecanismo colateral, las vesículas pueden endocitarse de inmediato por kiss and run (KR) y reabastecerse de transmisor, pasando rápidamente a formar parte de la poza liberable.

Para el caso de las vesículas de núcleo denso, el proceso varía un poco. Este tipo de vesículas brotan del aparato de Golgi, donde se abastecen de los elementos que transportarán (Kelly, 1991; Tooze, 1991; Tooze, 1991; Weldon y cols., 1993). Una vez que esto ha sucedido, las vesículas viajan al axón y de ahí, vía citoesqueleto, alcanzan su sitio de liberación. Una vez que liberan su contenido a través de la membrana plasmática, no sufren el proceso de endocitosis que hemos descrito antes, sino que deben ser sintetizadas continuamente en el Golgi y viajar nuevamente hasta los sitios de liberación (Weldon y cols. 1993; Wacker y cols. 1997). No obstante, hay evidencias crecientes de que las vesículas de núcleo denso también pueden reciclarse, ya sea por cubierta de clatrina (Annaert y cols. 1997) o por el proceso de kiss and run (Betz y Angleson, 1998; Artalejo, Elhamdani y Palfrey, 1998; Zhang y cols., 1998). Sin

embargo, no se conoce aún si estas vesículas recicladas vuelven a reabastecerse de transmisor y queden listas para liberarlo de nueva cuenta. Y si esto fuera posible, tampoco se sabe mediante que mecanismos pudieran reabastecer su contenido. O bien si se endocitan para dirigirse hacia otros sitios celulares, incluso a rutas lisosomales. En este trabajo nosotros proponemos algunas posibles explicaciones a estas interrogantes.

- **Criterios para considerar una sustancia como transmisor**

El concepto de neurotransmisor es tema aún de discusión. Puede considerarse, en general, que se trata de una sustancia que es sintetizada y almacenada en las neuronas, liberada durante la actividad neuronal y que entonces interactúa con receptores específicos en la membrana postsináptica acarreado cambios en la actividad postsináptica.

A pesar de todos estos parámetros, existen neurotransmisores que no cumplen con alguna o algunas de las características señaladas, entre ellos se cuenta por ejemplo al óxido nítrico, el monóxido de carbono y el ácido araquidónico, que no se encuentran vesiculados y que son mensajeros difusibles.

Los mecanismos mediante los cuales las moléculas liberadas desde la terminal presináptica tienen efecto sobre la célula postsináptica, dependen del tipo de receptor sobre el que actúan. La respuesta puede ser directa o indirecta. En las primeras el receptor es una molécula que se comporta al mismo tiempo como canal iónico, llamado por esto receptor *ionotrópico*, de manera que se trata de una respuesta rápida. En la segunda, en cambio, el receptor está acoplado a una cascada de segundos mensajeros que eventualmente activarán canales iónicos, a estos receptores se les conoce como *metabotrópicos*. Las moléculas que actúan sobre ambos tipos de receptores pueden ser las mismas, la variación en la respuesta, depende entonces del tipo de receptor que se active. Por ejemplo, existen dos tipos de receptores a acetilcolina, uno ionotrópico y

otro metabotrópico, ambos responden a la misma molécula, pero la respuesta es diferente. Lo mismo sucede para muchos otros transmisores, como GABA, glutamato, serotonina, etc. Las respuestas directas son más rápidas que las indirectas, sin embargo, las respuestas de estas últimas pueden ser de mayor amplitud y duración. En conclusión, la clave del proceso del mensaje sináptico está en cómo afectan la función de la célula sobre la que ejercen su acción y no necesariamente de la molécula liberada (Kaczmarek y Levitan, 1987; Kupfermann, 1991).

Co-transmisión. En la década de los 70's se encontró que muchas neuronas contenían varios péptidos diferentes y en algunos casos en combinación con otro u otros tipos de transmisores, por lo que se les denominó *cotransmisores* (Hökfelt y cols., 1977). La coexistencia de más de un transmisor en una sola neurona, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, es un fenómeno ampliamente distribuido en vertebrados e invertebrados e involucra a casi todos los sistemas sinápticos. De hecho, la coexistencia de transmisores parece ser la regla y no la excepción y es posible encontrarla en otros sistemas diferentes a los neuronales.

De los cotransmisores, los que despiertan particular interés son los péptidos, por encontrarse en una amplia gama de neuronas y por sus muy variadas acciones. Hay múltiples combinaciones entre péptidos y neurotransmisores y entre péptidos entre sí. De este modo una neurona puede tener uno o más neurotransmisores en combinación con diversos tipos de péptidos.

Como sabemos, los neurotransmisores están contenidos en vesículas, sin embargo también existe heterogeneidad entre la distribución de los transmisores en ellas. Mientras que algunos pueden localizarse solamente en las vesículas de núcleo denso, algunos otros se encuentran tanto en las de núcleo denso como en las claras y otros más sólo en las claras. En términos generales se considera que los péptidos se encuentran sólo en las vesículas de núcleo denso y los neurotransmisores pueden estar

en ambos tipos de vesículas, dando como resultado que mientras la transmisión se asocia comúnmente a la liberación del contenido de vesículas claras, la cotransmisión se asocia a la liberación del contenido de las vesículas de núcleo denso (Hökfelt y cols, 1987, Kupfermann, 1991; De Potter y cols, 1997).

Algunas veces los cotransmisores tienen efectos sinérgicos con los neurotransmisores potenciando o prolongando sus efectos sobre la terminal en la que actúan. Por ejemplo, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) potencia la acción de la sustancia P. Mientras que el efecto de ésta dura sólo uno o dos minutos, la secreción del CGRP lo prolonga por más de 30 minutos. Del mismo modo estas dos sustancias actúan sinérgicamente en la modulación del reflejo flexor nociceptivo (Hökfelt, 1991).

En general a este tipo de efectos se les llama *neuromodulación* y por extensión a las sustancias que los ejercen *neuromoduladores*. De lo anterior podemos concluir que algunos cotransmisores pueden tener efectos moduladores.

Considerados así, algunos de los transmisores clásicos pueden ser tomados en cuenta también como moduladores. Por ejemplo, la serotonina, que tradicionalmente se ha aceptado como un neurotransmisor clásico de bajo peso molecular, puede ser también vista como un regulador a nivel presináptico al incrementar el número de vesículas en los sitios de liberación o bien al activar algunos puntos sinápticos que hasta antes de su efecto permanecían silentes (Wang y Zucker, 1998).

Existen evidencias acerca de cómo la frecuencia de disparo de las células puede liberar de manera diferencial el contenido de ambas vesículas. Potenciales de acción únicos o a bajas frecuencias, parecen no ser capaces de producir exocitosis desde las vesículas de núcleo denso. Su liberación necesita trenes de alta frecuencia (Ivertfeldt y cols. 1989; Hökfelt, 1991; Weldon y cols, 1993; De Potter y cols., 1995; Bruns y Jahn, 1995). Esta diferencia en su liberación es importante. La síntesis de péptidos

parece estar también regulada por ciertas condiciones fisiológicas y/o patológicas, de hecho, pueden ser sintetizados bajo ciertas condiciones, como dolor, ejercicio, estrés, ansiedad, aprendizaje, etc. Un aspecto interesante sobre los péptidos es que pueden actuar como neuromoduladores o como neurotransmisores, siendo cada una de estas funciones independiente entre sí, (Kow y Pfaff, 1988; Kupffermann, 1991; De Potter y cols., 1995; Klimaschewski, Kummer y Heym, 1996).

Mientras que en el sistema nervioso los neurotransmisores excitados alcanzan su célula blanco y el mensaje se transmite a través de redes formadas por axones y dendritas, las hormonas al ser secretadas pasan al medio extracelular y de ahí a la sangre o bien directamente a la sangre y de ese modo son transportadas hasta sus sitios de acción.

- **Formación de Sinapsis en neuronas cultivadas**

El análisis detallado de la dinámica vesicular y de los mecanismos de transmisión y cotransmisión, requiere de sistemas fácilmente accesibles que permitan realizar la disección de cada uno de estos procesos.

El estudio de la formación de sinapsis en cultivo entre neuronas identificadas, se ha desarrollado principalmente en sistemas simples, como la aplisia o la sanguijuela, donde se pueden analizar fenómenos como modificaciones de membrana, crecimiento neurítico, influencias del sustrato, etc. Recientemente se han logrado cultivar también secciones de tejido embrionario de mamíferos, como tálamo, retina o hipocampo (Van de Pol y cols., 1998).

Las células cultivadas permiten estudiar las etapas de formación de sinapsis. Además han sido de gran utilidad para analizar los mecanismos de liberación de transmisor. De todas ellas, quizás las más estudiadas son las sinapsis que se forman entre células identificadas de sanguijuela.

Estas sinapsis son muy similares a las encontradas en vertebrados. Así, existen sinapsis eléctricas y sinapsis químicas, que presentan las

mismas características morfológicas y funcionales que cualquier otra estructura sináptica en algún otro sistema.

El desarrollo de sinapsis en cultivo en neuronas identificadas de sanguijuela se logró por primera vez en 1979 por Ready y Nicholls. Cuando el muñón de una célula de Retzius se siembra en contacto con el soma de otra célula de Retzius desarrollan sinapsis químicas unas horas después de que son sembradas. Además de que entre las 24 y 72 hs. también se acoplan eléctricamente. Si la configuración en cultivo cambia, colocando ambos somas en contacto, se desarrolla una sinapsis eléctrica antes de que pueda observarse transmisión química (Ready y Nicholls, 1979; Fuchs Nicholls y Ready, 1981; Liu y Nicholls, 1989).

En cultivo, las células de Retzius no sólo forman sinapsis entre sí, sino que son capaces de formar sinapsis químicas también con células sensoriales donde producen potenciales sinápticos hiperpolarizantes debido a una corriente de cloro (Fuchs, Henderson y Nicholls, 1982). Estas células sintetizan y liberan serotonina (5-HT) de manera cuántica como único transmisor, de modo que se ha demostrado que éste es el responsable de los cambios observados en las células postsinápticas con las cuales están haciendo contacto (Henderson, 1983, Henderson y cols., 1983). La serotonina se encuentra almacenada, tanto en vesículas claras como en vesículas de núcleo denso, aunque se desconoce si existen algunas otras moléculas en las vesículas de núcleo denso que puedan participar como cotransmisores (Kuffler, Nicholls y Drapeau, 1987). En todos los casos el muñón de la célula de Retzius es siempre presináptico y el soma siempre postsináptico.

Ultraestructuralmente, las sinapsis desarrolladas en cultivo entre células de Retzius y células sensibles a presión (P) se forman entre los procesos neuríticos de ambas células, entre ambos muñones o entre el muñón de la célula R y el soma de la P, siendo siempre la célula de Retzius la presináptica. La célula P nunca desarrolla estructuras presinápticas sobre la Retzius (Henderson y cols. 1983; Kuffler, Nicholls y Drapeau, 1987). Esta

combinación de células nunca desarrolla acople eléctrico (Fuchs, Nicholls y Ready, 1981; Fuchs, Henderson y Nicholls, 1982; Liu y Nicholls, 1989). En los sitios donde se ha establecido contacto sináptico, se observan grupos de vesículas sinápticas en aposición con la membrana plasmática, rodeadas por vesículas de núcleo denso. En el caso de pares de células de Retzius, la ultraestructura es similar a la descrita para la sinapsis Retzius-P, aunque en este caso, como hemos mencionado antes, dependiendo de la configuración en que se siembran, se pueden establecer contactos sinápticos bidireccionales (Fuchs, Nicholls y Ready, 1981). Cuando se siembra solo una célula de Retzius, esta es capaz de establecer sinapsis consigo misma, mediante pliegues de su propia membrana, a estas estructuras se les denomina *autapsis*, cuya morfología es similar a la descrita para sinapsis entre pares de células (Henderson y cols., 1983; Kuffler, Nicholls y Drappeau, 1987).

La serotonina es uno de los principales transmisores y moduladores del sistema nervioso de vertebrados e invertebrados. En la sanguijuela intacta, más del 50 % de la serotonina en el sistema nervioso central se encuentra en las células de Retzius. Se sabe que se sintetiza a partir de triptofano y/o 5 hidroxitriptofano y que se libera de manera cuántica y dependiente de calcio al despolarizarse las células (Henderson, 1983). En el animal, la serotonina tiene un doble papel, como transmisor en conexiones sinápticas y como modulador cuando es liberado al medio exterior, como sucede en los sistemas hormonales, interviniendo en varias conductas. En este último caso, actúa relajando la musculatura parietal, inhibiendo la excitación muscular proveniente de otras células (Muller, Nicholls y Stent, 1981). Las células de Retzius cuentan con una gran cantidad de contactos sinápticos con células mecanosensoriales, como las P, sensibles a la presión, esto podría indicar que pueden participar en las reacciones de alerta para activar los movimientos del animal (Szczipak y Kristan, 1995). Las células de Retzius participan también en la conducta de nado: cuando la cantidad de serotonina aumenta en la sangre del animal, se incrementa

también el tiempo de nado (Brodfoehrer y cols. 1995). Otro efecto de la serotonina es su acción sobre las glándulas mucosas de la pared corporal, incrementando su producción (Muller, Nicholls y Stent, 1981).

En este trabajo estudiamos algunos aspectos asociados a la liberación de serotonina. En particular abordamos la pregunta de si la serotonina utilizada como transmisor y como modulador es liberada desde sitios diferentes de la célula. Analizamos algunos de los posibles eventos asociados al reciclamiento de vesículas en neuronas en cultivo. Adicionalmente analizamos también, las posibles etapas en la formación y degradación de las terminales sinápticas.

HIPÓTESIS

La liberación de transmisor puede ser regulada o constitutiva, cada una desempeña un papel diferente en las neuronas.

Si las células de Retzius liberan serotonina a partir de vesículas claras y de núcleo denso y establecen contactos sinápticos con células específicas y además tiene efectos en sitios lejanos a los de su liberación en el ganglio, entonces la neurona es capaz de liberar 5-HT de manera regulada y constitutiva paralelamente.

Por otro lado, esta constitutiva implica una constante provisión de vesículas de núcleo denso, por lo cual deben ser capaces de reciclarse.

Los botones pueden formarse por la conjunción en el sitio activo de vesículas, mitocondrias, proteínas, etc. Aunque es probable que estos botones sean estructuras preensambladas que se dirigen hacia sus sitios de contacto por efecto de estímulos externos.

Material y Métodos

I. Aislamiento y cultivo de
células identificadas de sanguijuela
Hirudo medicinalis

II. Identificación de terminales
únicas con el colorante fluorescente
FM1-43

MATERIAL Y MÉTODOS

I. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS IDENTIFICADAS DE SANGUIJUELA *Hirudo medicinalis*.

El procedimiento seguido fue el descrito por Dietzel, Drapeau y Nicholls (1986). La disección consiste en colocar a la sanguijuela con la superficie ventral hacia arriba sobre un plato con silicón. Se realiza una incisión longitudinal media hasta encontrar la cadena ganglionar constituida por un ganglio cefálico y uno caudal, más 21 ganglios intermedios. Se retira la capa de tejido conectivo que envuelve a los ganglios y se extrae la cadena ganglionar la cual se coloca en una caja con silicón y conteniendo medio de cultivo L-15 con suero bovino fetal. Se abre la cápsula que recubre las células por medio de dos pinzas finas, para dejar expuestos los paquetes celulares. Los ganglios con las células expuestas se someten a un proceso enzimático con colagenasa y dispasa durante 40 a 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se hace un lavado con medio sin enzima y se identifican las células de Retzius por su posición extrayéndolas por succión con una pipeta de vidrio. Cuando las células se extraen del ganglio, su proceso primario se rompe y su membrana sella espontáneamente dejando sólo un muñón en el nacimiento del axón.

Una vez extraídas, las células deben ser sometidas a un proceso de lavado para su esterilización pasándolas por gotas de medio de cultivo dispuestas de manera sucesiva en una caja de Petri estéril.

Para cultivar las células se coloca concanavalina-A en una caja de cultivo y se incuban durante dos horas, tiempo al cual se lava y se coloca medio de cultivo L-15 sin suero bovino fetal. Las células se depositan en el plato de cultivo con el muñón en contacto con el fondo del mismo para que la célula tenga posibilidad de crecer.

II. IDENTIFICACIÓN DE SITIOS DE ENDOCITOSIS CON EL COLORANTE FLUORESCENTE FM1-43

- Tinción con el colorante fluorescente FM1-43

En 1992 se describió por primera vez el colorante fluorescente FM1-43, capaz de teñir terminales sinápticas (Betz, Mao y Bewick, 1992). Se trata de un marcador que se hace fluorescente sólo al adherirse de manera reversible a la membrana celular, de tal forma que cuando la membrana se internaliza durante la endocitosis, el colorante queda atrapado en la vesícula. Cuando la terminal es estimulada, la vesícula se fusiona de nuevo, el colorante es expulsado al medio extracelular y la célula pierde su marca fluorescente. Por estas razones, el FM1-43 ha sido utilizado para seguir ópticamente los fenómenos de exocitosis y reciclamiento vesicular en tiempo real (Betz y Wu, 1995; Angleson y Betz, 1997). Nosotros utilizamos este colorante para determinar cuál es la distribución y la densidad de los sitios de liberación dentro de la célula, tanto en células in situ, como en cultivo. La célula se tiñó con el colorante preparado a una concentración de 4 μM en agua bidestilada. La neurona debe ser estimulada para que pueda endocitar el colorante. Para tal efecto, modificamos la concentración de potasio y calcio del Ringer normalmente utilizado para las células de sanguijuela. La concentración de potasio se llevó de 4 mM a 40 mM y aumentamos también la concentración del calcio de 1.8 a 10 mM. Disminuyendo el sodio de 115 mM a 80 mM con el fin de no modificar las condiciones de osmolaridad de la solución. Con la finalidad de conocer la distribución de los sitios de liberación en neuronas in situ, éstas se tiñeron en el ganglio. Los ganglios descapsulados se expusieron al efecto del colorante en una solución Ringer 40 mM de potasio durante 10 minutos. Posteriormente se lavó esta solución con Ringer normal en perfusión

durante 20 minutos y se agrego colagenasa-dispasa para extraer las células y observarlas inmediatamente al microscopio de fluorescencia.

Una vez conocida su distribución en células in situ se emplearon en lo sucesivo neuronas en cultivo. Las células se incubaron por 10 minutos con el colorante en la solución de alto potasio. Posteriormente se retiró el colorante y se lavó con Ringer sin calcio y con magnesio a una concentración de 2 mM durante 5 minutos. Las neuronas teñidas se observaron mediante microscopía de fluorescencia intensificada con un microscopio de epifluorescencia Nikon- TMD (λ abs. 488 / λ em. 515) utilizando filtros para fluoresceína en un microscopio de epifluorescencia invertido. Las imágenes de los sitios teñidos con el colorante se capturaron en un procesador, almacenando varios planos focales de la neurona.

– Microscopía de fluorescencia intensificada y captura de imágenes

Cuando una célula teñida con un colorante fluorescente se ilumina constantemente, sufre un proceso denominado *blanqueo* que puede derivar eventualmente en daño o muerte para la célula. Para reducir este blanqueo se reduce la intensidad y el tiempo de iluminación. Sin embargo, con una luz de excitación de muy baja densidad, el número de fotones emitidos por el fluoróforo son tan limitados que la calidad de la imagen es muy pobre. Para resolver este problema se utilizan, por un lado, filtros de densidad neutra, los cuales disminuyen hasta en un 50% la intensidad de iluminación y por otro, un intensificador de imágenes. Un intensificador es un dispositivo electrónico el cual acepta una pequeña cantidad de luz y produce una imagen más brillante.

La luz emitida por la estructura teñida con el fluoróforo, pasa hacia el intensificador, el cual está conectado a una cámara DCC, la imagen ya digitalizada por la cámara es entonces proyectada, mediante un controlador, hacia un monitor y una computadora donde puede ser capturada mediante un programa analizador de imágenes (Biocom).

- **Microscopía confocal**

Algunas de las células teñidas se observaron al microscopio confocal. La longitud de onda de excitación empleada fue de 488 nm y la de emisión de 585 nm. Ahí, se realizaron observaciones monitorizando por planos focales las células a pasos de 1 μm cada uno de ellos y promediando 5 imágenes, iniciando desde el plano más profundo de la neurona, es decir, donde se encuentra en contacto con el fondo del plato de cultivo, hasta llegar al polo superior.

También se hicieron reconstrucciones tridimensionales de las células teñidas con este colorante

- **Conteo de sitios de endocitosis teñidos con FM1-43**

Para contar los sitios de endocitosis en cada uno de los planos focales se utilizó el programa computacional "Scion" (image NIH) en el cual se acotan las medidas de cada una de los sitios teñidos (μm), así como los parámetros de la intensidad y umbral de tinción en escala de grises. De esta manera el programa cuenta cada una de las terminales sin repetir su conteo en el corte subsecuente, eliminando cualquier otro punto fluorescente que no corresponda estrictamente al acotado inicialmente.

Para determinar su distribución dentro de la célula, se consideró a ésta como una esfera y se calculó su radio y superficie. La célula se dividió en segmentos que corresponden al 10% de su superficie y se contabilizó el total de sitios distribuidos en cada región, en el conocimiento de que cada vez que el radio disminuye un 10% de su valor original, la superficie del segmento lo hace en un 5% y viceversa. Como se muestra en la figura 2, cada una de las observaciones a diferentes planos focales es un corte en esa esfera, de tal manera que se puede calcular la superficie del segmento de esfera por debajo de ese corte mediante la fórmula:

$$S = 2\pi R \left(R - \sqrt{R^2 - r^2} \right)$$

- donde:
- S** es la superficie del segmento de esfera determinado por el corte;
 - R** es el radio de la esfera;
 - r** es el radio de la circunferencia del segmento de esfera.

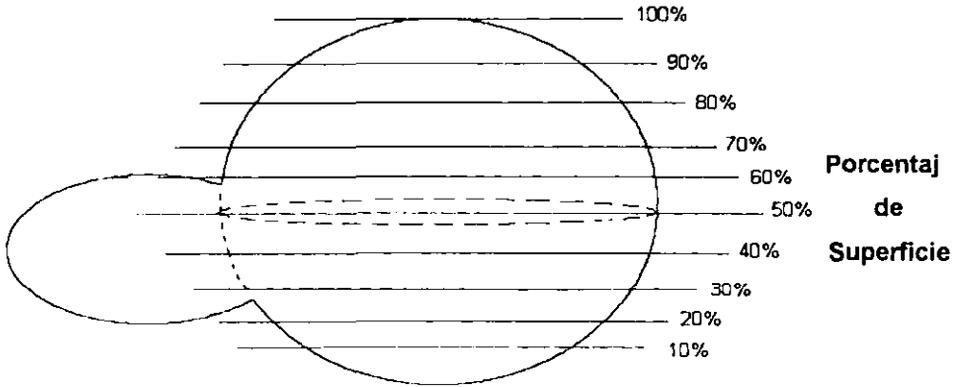
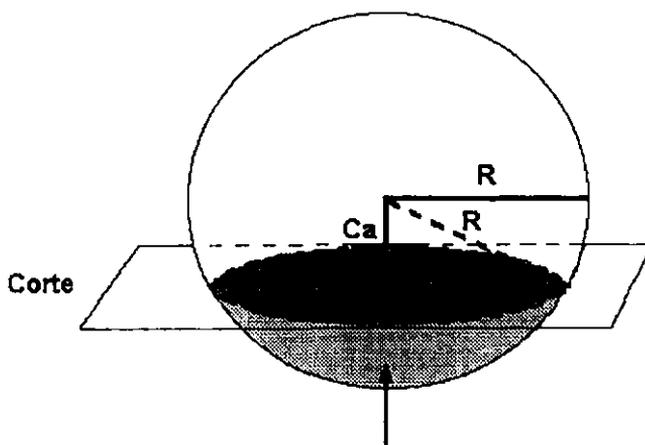


Figura 2. El soma celular, considerado como una esfera, se divide en cortes de 10% cada uno, de modo que se contabilizan el número de sitios de endocitosis en cada uno de esos segmentos de la esfera.

Cada uno de los planos focales es un corte en la célula. Como se observa en la figura 3, se determina un triángulo rectángulo entre el radio de la esfera (R), el radio de la circunferencia que se forma por el corte (r) y la distancia que separa el origen de la esfera y el origen de la circunferencia (ca). Para poder realizar el cálculo del área del segmento de esfera, es necesario conocer el valor del radio de la circunferencia. Este valor puede conocerse mediante el teorema de Pitágoras



$$S = 2\pi R \left(R - \sqrt{R^2 - r^2} \right)$$

Figura 3. Diagrama de la esfera y la superficie del segmento determinado por el corte, se muestra también el triángulo a partir del cual se calcula el valor de r y la fórmula para el cálculo de la superficie del segmento.

III. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Para conocer la distribución y la densidad de los sitios de liberación en las diferentes regiones de la célula de Retzius hicimos uso de la microscopía electrónica de transmisión.

Las células se sembraron sobre concanavalina-A y se procedió a preparar las células de acuerdo a la técnica descrita por Kuffler, Nicholls y Drapeau (1987).

Las células se fijaron en reposo en glutaraldehído al 0.6% y paraformaldehído al 0.4% en amortiguador de cacodilato al 0.08 M a pH de 7.4 durante 10 minutos, seguidos por una postfijación con tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilato por 10 minutos más, al término de los cuales se lavó nuevamente con el amortiguador de cacodilato. Las

células se deshidrataron en alcoholes seriados del 25% al 100% y se impregnaron en una solución alcohol/epon (2:1, 1:1) y epon puro, con cambios sucesivos hasta estar seguros de tener sólo epon impregnando a la célula dejándolas toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se retiró el epon y se colocó nuevo dejando polimerizar a 60° C durante 48 horas. Los bloques conteniendo a la célula fueron montados sobre pequeños postes de epon colocando a la célula hacia arriba para llevarlos al ultramicrotomo. Se obtuvieron cortes únicos y seriados de color plata y grises, los cuales se tñeron con acetato de uranilo durante 6 minutos y citrato de plomo por 2.5 minutos.

El grosor del corte puede determinarse aproximadamente distinguiendo el color que presentan al reflejar la luz. El color de interferencia es un fenómeno físico y se debe al reflejo que presenta el corte en su superficie y en su profundidad, los cuales al colocarse en fase producen el color que los caracteriza.

De este modo los grosores se determinan de la siguiente forma:

Gris plateado, 50-60 nm

Plateado, 60-90 nm

Dorado pálido, 90-120 nm

Dorado oscuro, 120-150 nm

Violeta, 150-190 nm

Azul, 240 nm

Verde, más de 240 nm.

Todos los cortes menores a 50 nm van de gris hasta negro el más fino.

Los cortes se llevaron al microscopio electrónico de transmisión (JEOL-1010) y se observaron a diferentes magnificaciones.

Resultados

- I. Liberación diferencial de transmisor
- II. Análisis estructural de las terminales sinápticas. Ciclo vesicular
- III. Formación de terminales sinápticas a partir de cúmulos de vesículas preensamblados

RESULTADOS

I. LIBERACIÓN DIFERENCIAL DE TRANSMISOR

- Distribución de sitios de liberación

El análisis cuantitativo de la distribución de la marca fluorescente del FM1-43 en células de Retzius in situ mostró que los sitios de liberación no se distribuyen de manera uniforme.

Al observar al microscopio de epifluorescencia las células teñidas en el ganglio, lo primero que se aprecia es que los sitios de liberación se encuentran en el soma pero no en el proceso primario (fig. 4). Esta marca es producto de la tinción en vesículas internalizadas que son incorporadas a las células al estimular con alto K^+ , de modo que lo que se observa son grupos de vesículas endocitadas marcadas con el colorante. En células teñidas en cultivo se observó exactamente el mismo patrón (fig. 5). Los somas presentan la tinción de los sitios endocitados, pero muy pocas veces se aprecia en el muñón. Como se ve, la distribución de las estos sitios no parece ser efecto de un artefacto del cultivo. Por esta razón, los experimentos se realizaron en lo sucesivo en células cultivadas.

Cuando las células se teñieron y estimularon con K^+ en ausencia de Ca^{2+} , no se apreció marca específica, como la que sí se ve cuando se estimula en presencia de Ca^{2+} , esto podría indicar que el proceso de endocitosis en nuestras células es dependiente de calcio.

La distribución de la marca fluorescente no es uniforme, sigue un gradiente hacia sitios específicos. En los planos focales más cercanos al sustrato hubo una mayor densidad de marca fluorescente, la cual disminuyó conforme se asciende en los planos focales hasta no encontrar más marca en el polo superior de la célula (fig. 6 y 7). Los grupos vesiculares miden aproximadamente $1 \mu m$ de diámetro, lo cual coincide con el diámetro de las

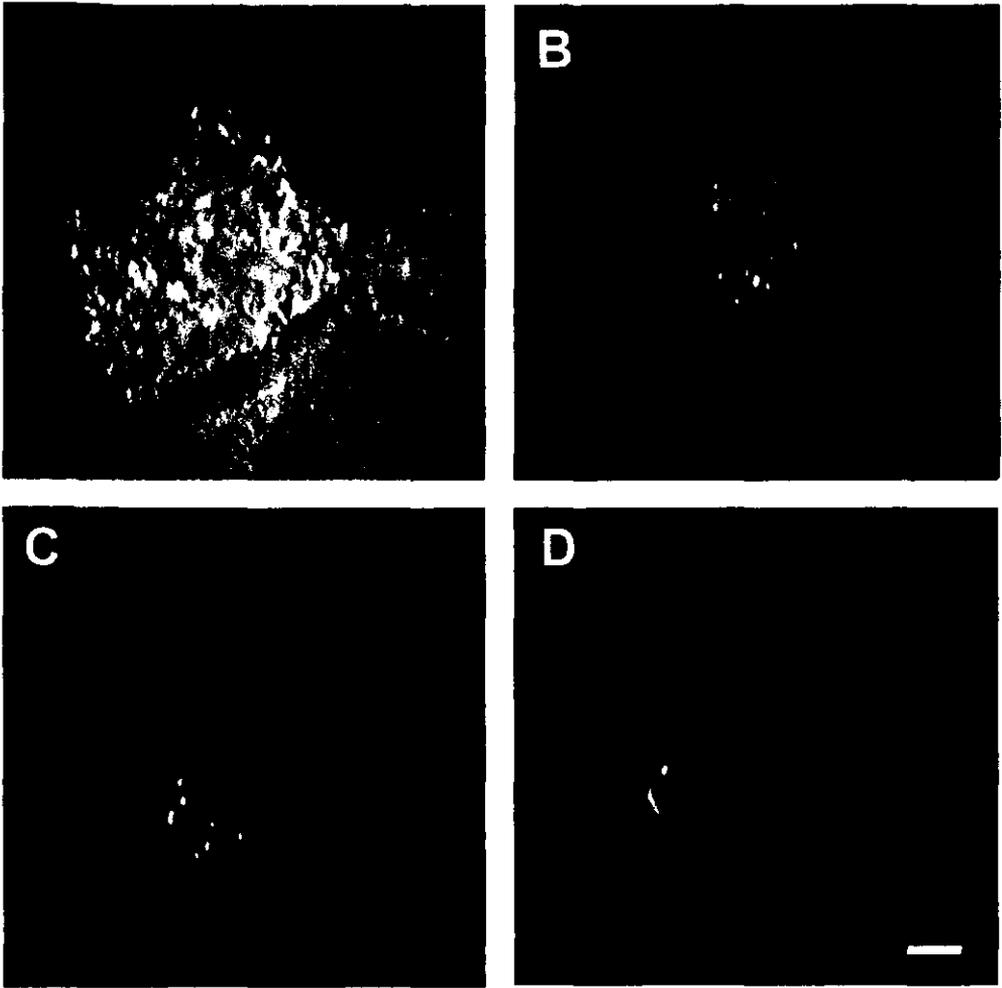


Figura 4. Célula de Retzius teñida en el ganglio con FM1-43 y posteriormente aislada y mantenida en cultivo. A, Imagen en DIC que muestra la misma célula de los paneles B, C y D. B, C y D, tres imágenes en fluorescencia de planos focales sucesivos tomados en sentido ascendente desde el más inferior (B), cada uno a una distancia aproximada de 10 μm . No hubieron sitios de endocitosis en la zona del proceso primario, solo se observaron en el soma. Escala: 10 μm .

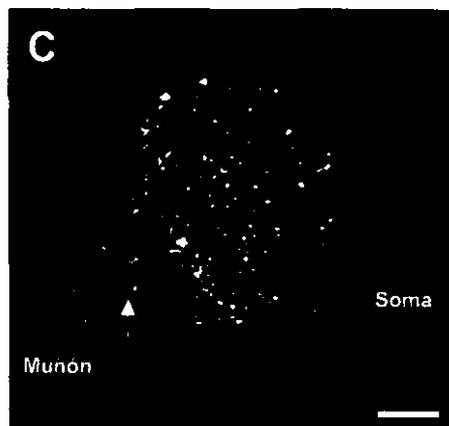
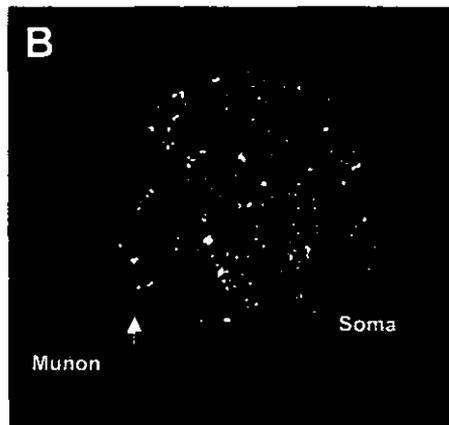
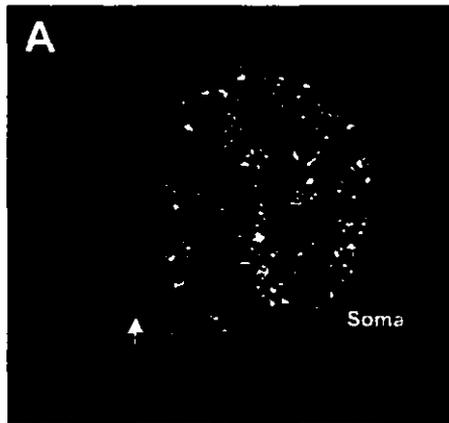


Figura 5. Reconstrucción tridimensional de una célula teñida con FM1-43, vista desde diferentes ángulos. El número de terminales marcadas es más abundante en el soma que en el muñón. La flecha indica el sitio de unión entre el soma y el muñón. Escala, 10 μm .

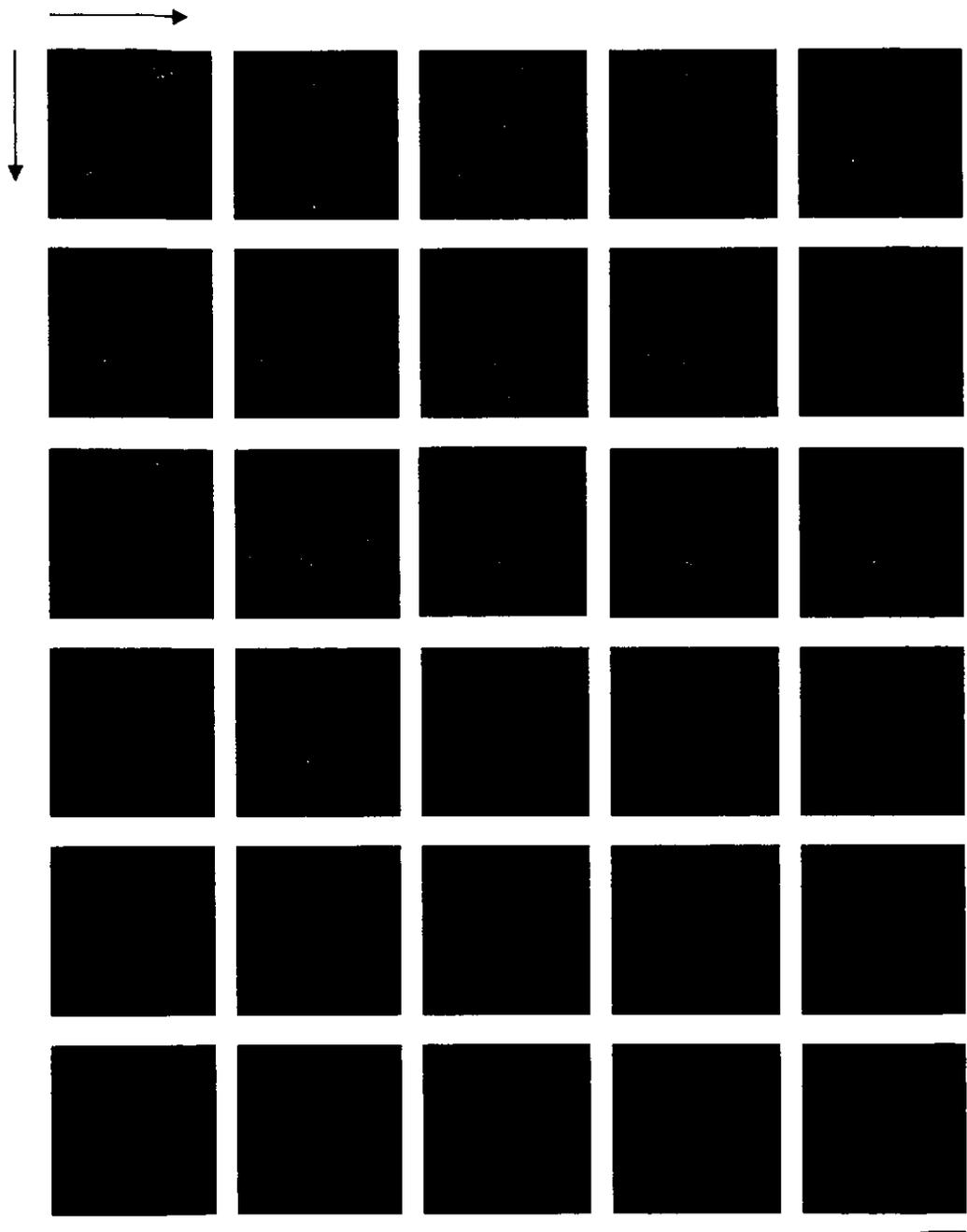


Figura 6. Montaje de 30 planos confocales tomados en sentido ascendente cada 2 micras, a partir del fondo del plato, de un par de células teñidas con FM1-43 y observadas al microscopio confocal. El número de terminales teñidas disminuye conforme se asciende en los planos focales. Escala, 10 μ m.

terminales medido previamente en micrografías electrónicas (Kuffler, Nicholls y Drapeu, 1987).

Distribución de sitios teñidos con FM1-43

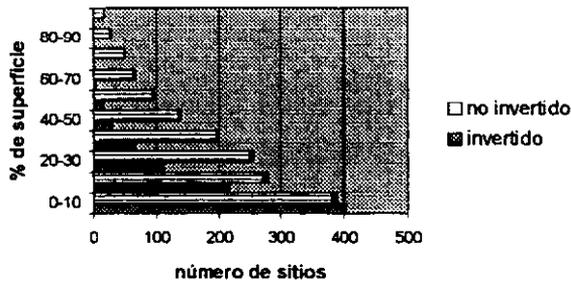


Figura 7. Gráfica que muestra la distribución promedio de sitios teñidos con FM1-43 por planos focales, observados al microscopio invertido (n=8) y bajo microscopio no invertido (n=7) con objetivo de inmersión en agua. El número de sitios de endocitosis teñidos disminuye conforme se asciende en el plano focal. Este fenómeno se repite en todos los casos. estudiados.

Para descartar la posibilidad de que esta distribución se debía a un efecto óptico donde no es posible observar los sitios de endocitosis teñidos en el polo superior por encontrarse más lejos de la fuente de luz y porque su luz emitida y capturada debe atravesar toda la célula, teñimos neuronas con FM1-43 y las observamos en un microscopio de fluorescencia no invertido mediante un objetivo de inmersión en agua. Con este procedimiento confirmamos que la densidad de los sitios de endocitosis efectivamente es mayor en los planos más profundos, aunque ciertamente es posible observar sitios teñidos en planos mas superiores a los obtenidos previamente (fig. 7).

Para determinar la distribución de estos sitios en el muñón, este se dividió en tres zonas en sentido perpendicular a su eje longitudinal. Al contabilizar el número de sitios teñidos, encontramos que su mayor

densidad se localizó en la parte proximal del muñón, disminuyendo hacia la zona distal (fig. 8).

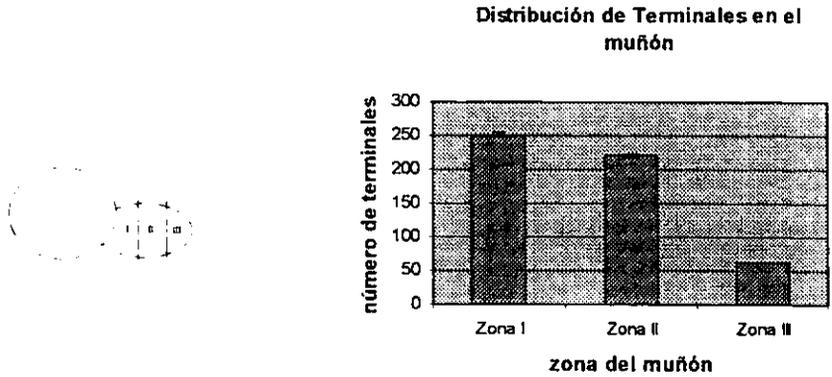


Figura 8. Distribución de los sitios teñidos con FM1-43 en el muñón. Como se muestra en el esquema de la izquierda, el muñón se dividió en tres zonas desde su origen en el soma. Los puntos fluorescentes se contaron en cada una de las tres zonas. Se trata de un grupo representativo de 15 células. Las marca se localiza principalmente en la zona proximal del muñón.

- **Efecto de la formación de sinapsis sobre la distribución de las terminales**

Si factores del medio externo, como el sustrato por ejemplo, pueden influir sobre la distribución de los sitios de liberación, entonces la influencia de blancos celulares, como posibles sitios de contacto sináptico, podrían tener efecto sobre la distribución de las terminales sinápticas. Por lo tanto, decidimos buscar si el efecto de un contacto celular causaba algún cambio en la organización de las terminales sinápticas. Se colocaron dos células de Retzius en contacto muñón-soma, con el objeto de que se formaran sinapsis entre ambas células (fig. 9).

Para comprobar que las células se encontraran haciendo contacto sináptico, se realizaron registros de potenciales sinápticos establecidos los pares de células. El potencial de reposo fue de -50 mV. La amplitud del potencial sináptico fue de aproximadamente 8 mV y siguió al inicio del potencial de acción presináptico con un retardo aproximado de 65 ms, (fig 9), similares a los descritos en la literatura (Ready y Nicholls, 1979; Fuchs, Nicholls y Ready, 1981).

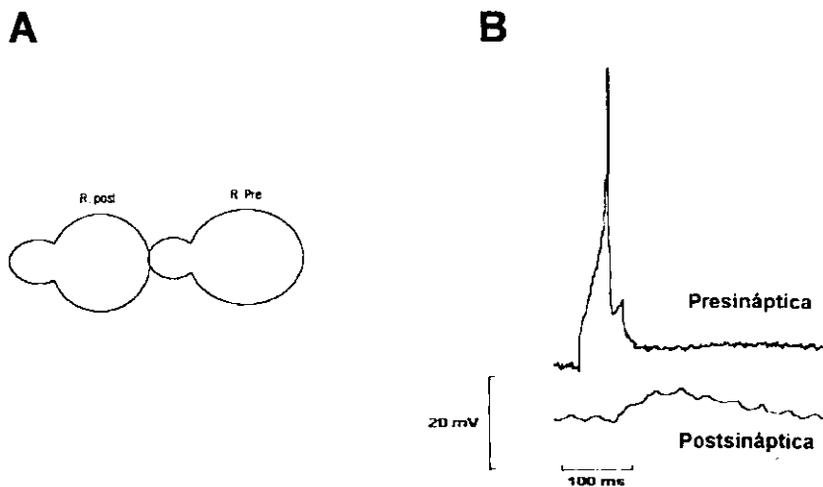


Figura 9. A, El esquema muestra la conformación en la que se siembran y registran las células. B, Un potencial de acción de la célula de Retzius produce un potencial sináptico en la célula de Retzius postsináptica después de 48 hs de cultivo.

Al teñir estas células a las 48 hs. de cultivo, se aprecia que la marca fluorescente persiste en los somas de las dos células manteniendo el patrón observado previamente en células únicas, pero como dato interesante

aparece fluorescencia en la zona del muñón presináptico, en la región del contacto con la célula postsináptica (Fig. 10).

Este reacomodo de las terminales en el muñón, no alteró el patrón de distribución de la marca fluorescente del soma encontrado en células únicas. Estos resultados sugieren que puede existir liberación del contenido vesicular fuera de los botones sinápticos.

II. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LAS TERMINALES SINÁPTICAS. CICLO VESICULAR

- Diferencias ultraestructurales entre el muñón y el soma celular.

Como se observó antes, en células aisladas la mayor densidad de sitios teñidos se encuentra en el soma, por lo tanto buscamos ultraestructuralmente esta distribución de las terminales en las neuronas. El análisis mediante microscopía electrónica mostró que las características citoplásmicas, tanto en el muñón como en el soma son iguales, sin embargo, los botones sinápticos sólo se encontraron en la región del muñón, nunca en el soma. Por otro lado, la distribución de las vesículas de núcleo denso es también diferente, ya que se observa una densidad mucho mayor de ellas en el soma cuando se compara con el muñón. En las preparaciones se observa una gran cantidad de vesículas de núcleo denso distribuidas en toda la superficie, esta abundancia es mayor en los sitios más cercanos al sustrato sobre el que se sembró la célula, correspondiendo con las observaciones de microscopía de fluorescencia. También en esos mismos cortes se puede apreciar una gran densidad de mitocondrias, las cuales además de ser indicadores de adecuado estado de preservación de la célula, nos indican la gran actividad metabólica que debe estarse llevando a cabo en esos sitios (fig. 11).

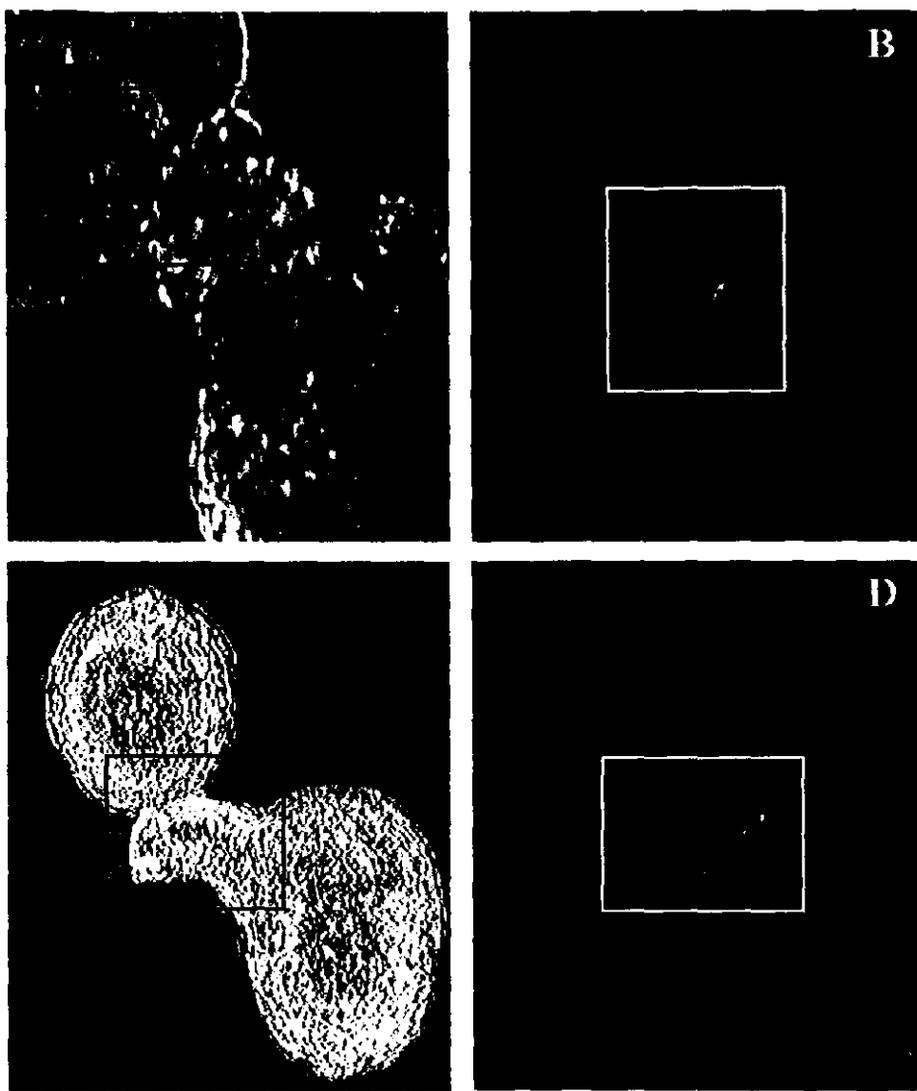


Figura 10. Micrografías que muestran la concentración de terminales en la zona de contacto (recuadros). A y C, imágenes en luz transmitida; B y D, imágenes de fluorescencia de sitios de endocitosis teñidos con FM1-43. Los recuadros enmarcan los sitios de contacto. Escala: A, B y D, 2 μm ; C, 5 μm .

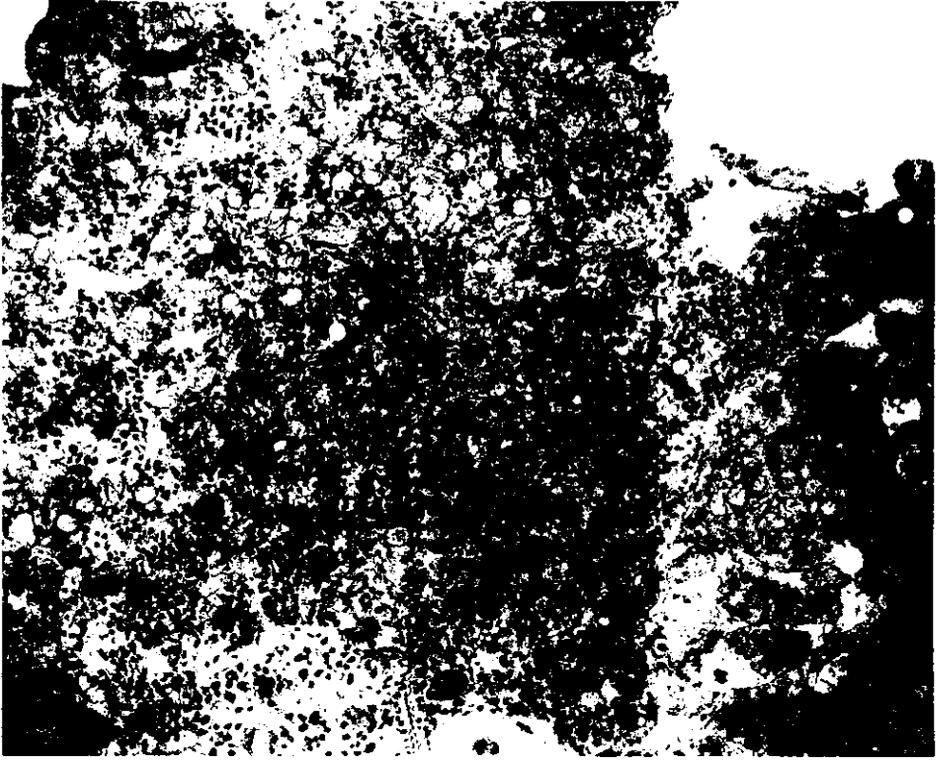


Figura 11. Micrografía de un corte cercano al sustrato de una célula de Retzius en la que se muestra la gran cantidad de vesículas de núcleo denso y mitocondrias. Escala, 500 nm.

- Características de las vesículas de núcleo denso

En todas las micrografías en las que aparecen vesículas de núcleo denso se aprecia una característica peculiar, que tanto sus diámetros como la densidad de sus núcleos varían (fig. 12). Los diámetros de las vesículas van desde 70 hasta 150 nm.

Considerando sus densidades las clasificamos básicamente en tres tipos, definidas arbitrariamente como:



Tipo I: Vesículas con un núcleo muy denso ocupando prácticamente la totalidad del diámetro de la vesícula.

Tipo II: Vesículas con un núcleo denso, que puede ser central o excéntrico.

Tipo III: Vesículas con un núcleo muy pálido, central o excéntrico.

En algunos casos se pudieron apreciar vesículas con interior claro, pero cuyo diámetro corresponde a vesículas de núcleo denso. La posibilidad de que esta diferencia morfológica de las vesículas de núcleo denso se deba a artefactos causados por el corte, está descartada por dos razones: 1) las vesículas son de forma esférica de manera que independientemente del sitio en que se corten siempre aparecerá su núcleo y obviamente no hay razón para que su densidad cambie; 2) en algunos casos, el núcleo de estas vesículas es excéntrico, además de las diferencias en sus densidades. Observaciones similares ya han sido reportadas antes (Henderson y cols. 1983, Kuffler, Nicholls y Drapeau, 1987).



Figura 12. Micrografía electrónica donde se observa un cúmulo que contiene los tres tipos de vesículas de núcleo denso, en cuanto a su diámetro y densidad. Escala, 100 nm.

- **Imágenes de endocitosis vesicular**

El estudio detallado de la ultraestructura de estas células permitió como ventaja adicional, obtener información acerca de las posibles etapas en el reciclamiento vesicular. Esto lo consideramos de especial interés debido a que los intentos por detectar el reciclamiento de vesículas de núcleo denso han sido muy complicados (Annaert y cols. 1997; Betz y Angleson, 1998; Artalejo, Elhmdani y Palfrey, 1998; Zhang y cols., 1998).

En dos células fue posible apreciar zonas de aparente endocitosis vesicular. En la primera de ellas se observa un proceso alargado, de aproximadamente 650 a 700 nm de longitud con una estructura vesicular, de aspecto claro, unida a la membrana plasmática por un pedículo de alrededor de 10 nm de longitud (fig. 13). Esta estructura tiene un diámetro de entre 70 a 80 nm. No hay pérdida de la continuidad de la membrana plasmática por lo que posiblemente se trate de una figura de endocitosis y por el diámetro de la estructura pudiera tratarse de una vesícula de núcleo denso.

En la segunda, hay una imagen de una muesca en la membrana que limita el proceso neurítico, la cual podría corresponder a una figura omega de exocitosis de una vesícula sináptica o a una de endocitosis de membrana, formando parte del proceso de reciclaje vesicular, aunque no se aprecia ninguna cubierta densa en la membrana que sugiera reciclaje mediado por clatrina. En este proceso neurítico se aprecia una estructura de aspecto discretamente denso, alargado, más angosto en el centro que en ambos extremos, que tal vez corresponda a una cisterna (Fig. 14).

- **Posibles etapas en el ciclo de vida de las vesículas sinápticas**

Cuerpos Laminados. El reciclamiento vesicular implica tener cerca de la membrana sitios capaces de reabastecer de transmisor las vesículas recién endocitadas. En una serie de 7 cortes de una misma célula, pudimos

A**B**

Figura 13. A, Imagen de una vesícula reciclándose en la región del soma de la célula (flecha). Por su diámetro parece tratarse de una vesícula de núcleo denso. B, Acercamiento de la zona indicada por el recuadro en A. Escala, 100 nm.



Figura 14. Una imagen omega de una vesícula clara (flecha), en la región del muñón de la célula. El asterisco indica una cisterna. Escala : 250 nm.

apreciar en el citoplasma, un puntillero obscuro, organizado en ciertas zonas en forma de roseta, de diámetro muy fino, de aproximadamente 10 nm, que pudieran corresponder a microtúbulos cortados transversalmente o bien a ribosomas. En algunas zonas se observa una serie de pequeños anillos dispuestos en forma secuencial a manera de rosario, en cuyo extremo hay una vesícula de núcleo denso. Es posible que se trate de retículo endoplásmico cortado transversalmente y que esos gránulos formen parte de la sustancia de Nissl como ribosomas. En muchos casos se pueden observar vesículas de núcleo denso asociadas a estructuras laminares o tubulares. La característica más evidente en este grupo de micrografías es la presencia de una estructura de forma alargada, muy cerca de la membrana plasmática, de diámetro mayor de aproximadamente 350 nm y menor de 200 nm y que recuerda una impresión por huella digital. Observada con detenimiento se aprecia que está formada por una aposición mas o menos regular de estructuras tubulares membranales con algunas interrupciones claras, a manera de islotes. En algunos sitios semejan un panal. Se ve claramente que en los extremos tiene a cada lado proyecciones tubulares que se continúan con su sistema laminar a manera de cuernos y que corresponden a retículo endoplásmico. Pueden observarse algunas mitocondrias rodeándola. Coronando esta estructura se ven algunas vesículas de núcleo denso (fig. 15). Estas estructuras son identificadas como *cuerpos laminados*. La relación de continuidad que tienen con el retículo endoplásmico y la presencia de abundantes proteínas, lípidos y carbohidratos parece hacer de los cuerpos laminados sitios de abundante síntesis, por lo que podrían ser, por su cercanía a la membrana plasmática y su contacto con vesículas de núcleo denso lugares donde pudieran reabastecerse las vesículas sinápticas (Peters, Palay y Webster, 1991).

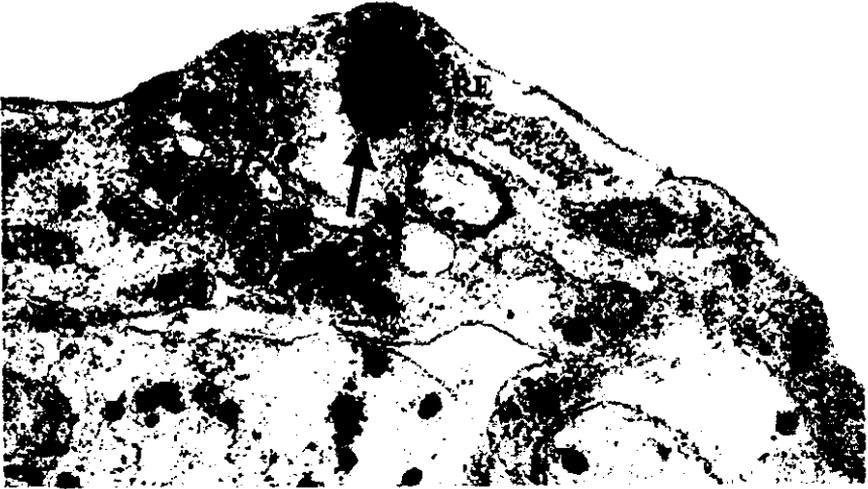


Figura 15. Micrografías electrónicas de dos cortes seriados, donde se aprecia un cuerpo laminado (flechas) y el retículo endoplásmico (RE) uniéndose a él. Escala 200 nm.

- Degradación de las terminales sinápticas: Cuerpos Multivesiculares

Otro tipo de estructura que llama la atención en nuestros cortes son los cuerpos multivesiculares. Los *cuerpos multivesiculares* (CMV) fueron descritos por primera vez por Palay y Palade en 1955 (Holtzman, 1989). Se trata de cuerpos esféricos, limitados por membrana y que contienen en su interior vesículas de diversos diámetros o formas y algunas otras inclusiones como filamentos, gránulos, masas densas irregulares y membranas. Este tipo de organelos son considerados como endosomas que eventualmente se fusionan a lisosomas (Futter y cols., 1996). Existen pruebas que demuestran que algunos productos endocitados e incluso componentes de la membrana plasmática pasan hacia los CMV para formar parte del aparato endocítico prelisosomal (Turek, Ieamon y Low, 1993; Wittich, Volkhardt y Zimmerman, 1994; Hersch y cols. 1997; Zhang y cols., 1998). Esto implica que el cuerpo multivesicular sufre una maduración en la cual eventualmente pierde sus constituyentes endosómicos, como por ejemplo sus proteínas de reciclaje y adquiere características lisosomales, como hidrolasas activas (Murphy, R. P. 1991; van Deurs, B. y cols. 1995).

Distribuidos en el citoplasma somático y del muñón, es posible localizar algunas estructuras de forma aproximadamente circular, circunscritas por membrana, en cuyo interior se encuentran organelos vesiculares. Este tipo de formaciones tienen diversas características. En algunos casos pueden contener sólo vesículas claras, en otros principalmente densas, otros más ambos tipos y en otros se observan algunas vesículas, densidades y una gran cantidad de membranas en su interior (fig. 16). Los diámetros de las estructuras vesiculares, coinciden claramente con los de las vesículas claras y de núcleo denso.

En dos micrografías seriadas (fig. 17), se observa la presencia de una estructura de forma irregular, muy densa, de un diámetro aproximado de 370 nm y que pudiera corresponder a un lisosoma.

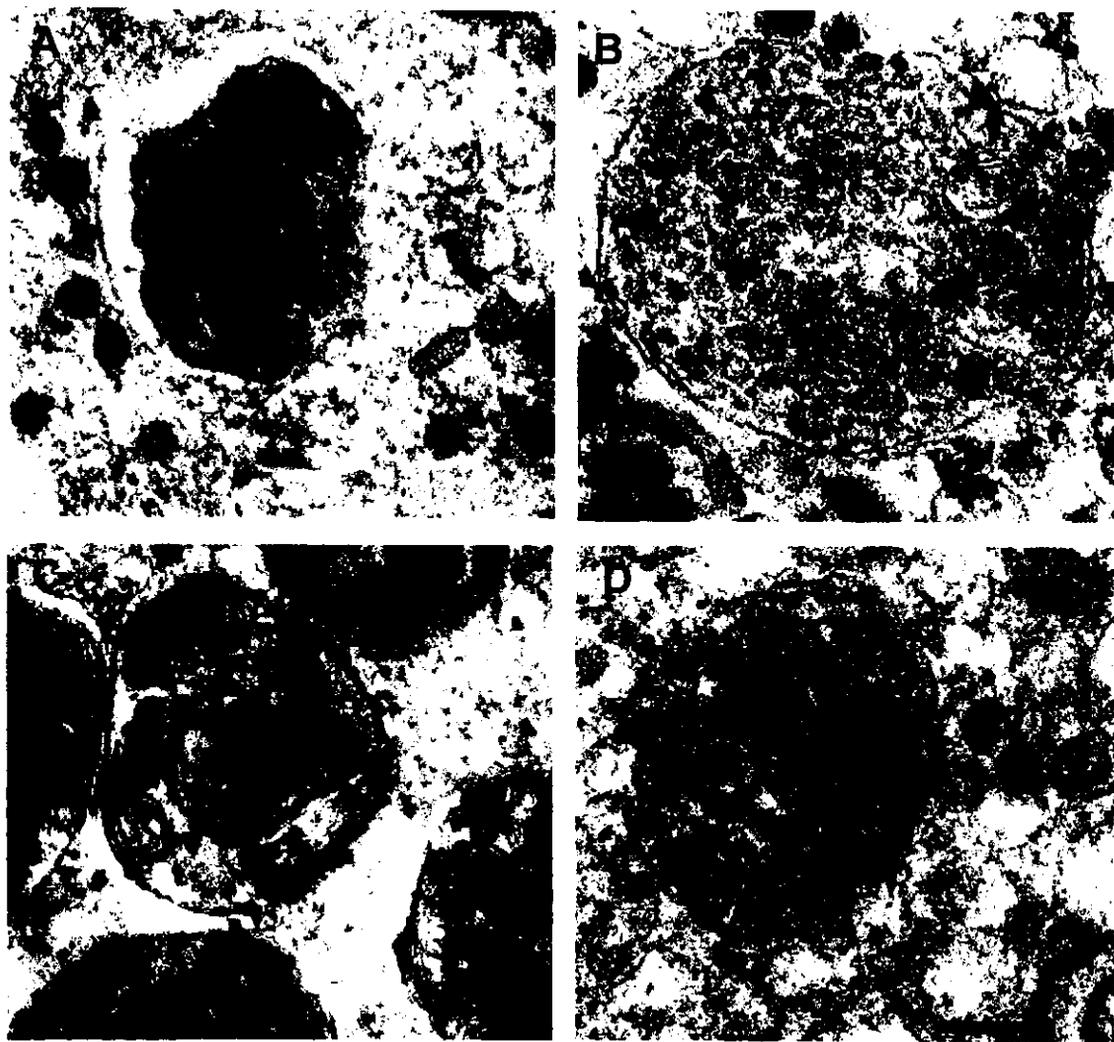


Figura 16. Micrografías electrónicas de cuatro aspectos diferentes de los cuerpos multivesiculares en las células de Retzius. Considerados estructuras prelisosomales, estos endosomas pueden contener en su interior vesículas de núcleo denso (A), vesículas claras (B), membranas y algunos otros restos amorfos (C), vesículas claras y vesículas de núcleo denso (D). Escala, 200 nm.



Figura 17. Micrografías electrónicas seriadas, subsecuentes a las de la figura 8, donde aparece un lisosoma (flechas). Escala, 200 nm.

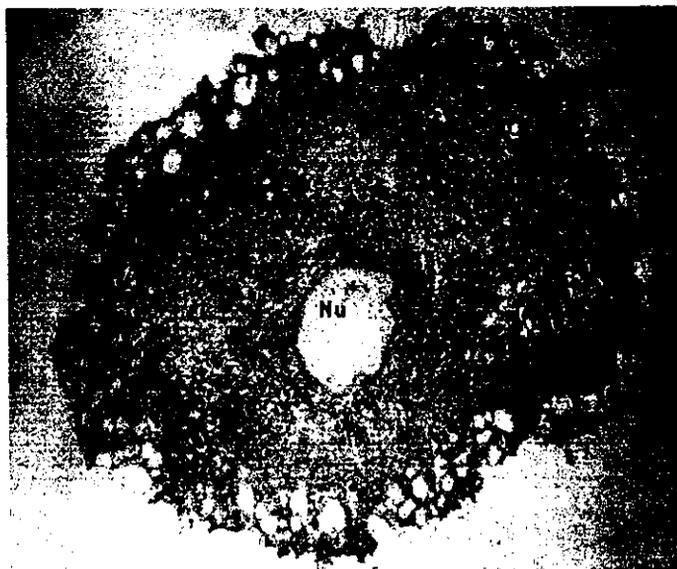


Figura 18. Micrografía electrónica de un aspecto general de la célula, se aprecia su núcleo de forma irregular (Nu.). Escala, 5 μ m.

- Morfología nuclear

La endocitosis es un proceso celular utilizado para el secuestro e internalización de sustancias solubles o unidas a la membrana plasmática. Se sabe desde los años 30's que muchas de esas estructuras endocitadas pueden seguir un camino centrípeto y pueden alcanzar regiones centrales de la célula, incluso en la vecindad o muy cerca del núcleo (Herman y Albertini, 1984).

El núcleo de las células de Retzius fue de forma irregular, notablemente grande, de hasta 20 μm de diámetro (Fig. 18).

En nuestras micrografías se logró apreciar claramente la doble membrana nuclear. Presentó como característica importante en la parte interna y adosado al cariolema una serie de anillos, que en algunas zonas son una línea única, pero en otras regiones son dos o aun más llegando a formar racimos (fig. 19).

En algunos de estos anillos fué posible observar, sobre todo cuando se encuentran arracimados, un pequeño punto central. La formación en forma de racimos, puede deberse al sentido en que fue hecho el corte, cuando este pasa de manera tangencial sobre la membrana nuclear, el aspecto que da es precisamente de un racimo constituido por el cariolema y sus poros. Estas estructuras corresponden a los poros de la membrana nuclear, siendo la luz del poro el punto denso en el centro (Fig. 20).

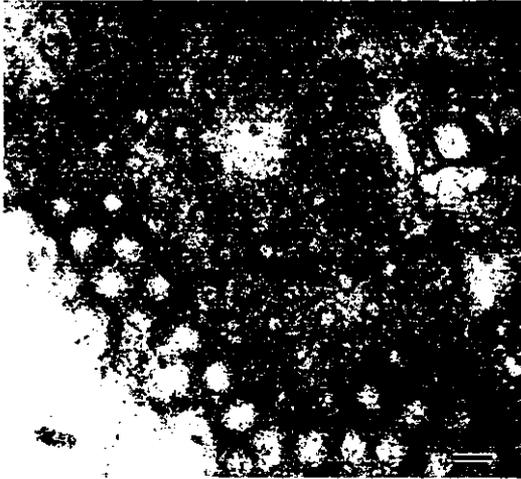
Alrededor del núcleo se apreció una abundante cantidad de vesículas de núcleo denso, las cuales parecen seguir un patrón de distribución bien organizado. Algunas de estas vesículas se encontraban en contacto con la membrana nuclear, incluso entre ambas capas del cariolema se pudo observar una densidad muy similar a la de las vesículas de núcleo denso (fig. 21).

En sitios muy cercanos al núcleo fue posible encontrar Golgi en estrecha relación con algunas vesículas de núcleo denso, así como algunas



Figura 19. Núcleo de una célula de Retzius a mayor aumento, donde se aprecia la serie de poros del cariolema (flechas) y en algunas zonas en forma de racimos por el sentido del corte (asteriscos). Escala, 1 μm .

A



B



Figura 20. Detalle de los poros de la membrana nuclear. En algunos sitios del cariotema pueden apreciarse los poros agrupados en racimos (A), de modo que es posible localizar al centro de ellos un punto más denso que corresponde a la luz del poro (flechas) (B). Escalas, A: 100nm; B: 200 nm.

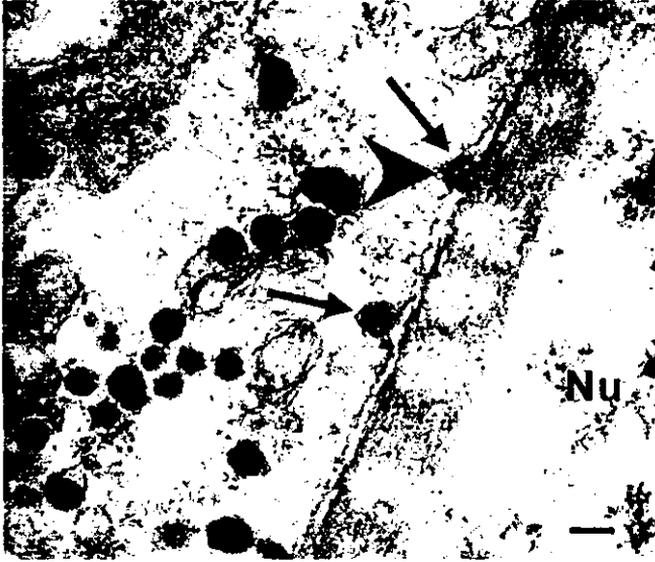


Figura 21. Aspecto de la membrana nuclear. Se observa una estrecha relación entre las vesículas de núcleo denso y el núcleo celular (Nu). En esta micrografía existen dos vesículas en contacto físico con él (flechas). Una de ellas aparece entre las dos capas de la membrana nuclear (punta de flecha). escala, 100 nm.

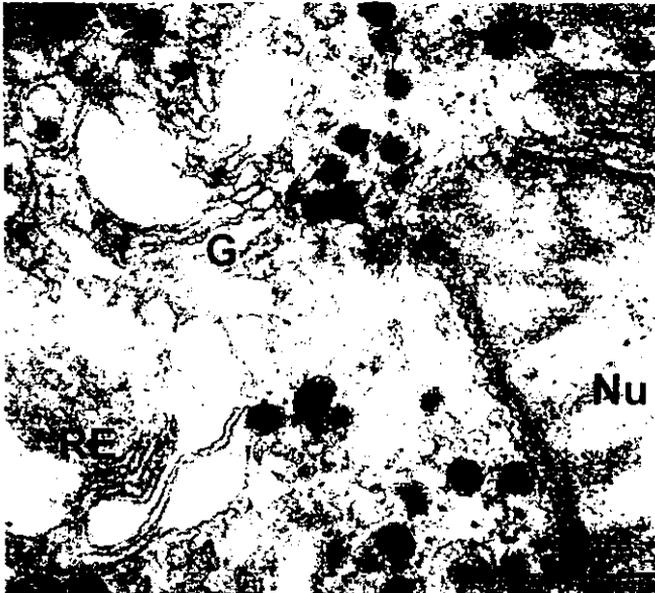


Figura 22. Micrografía electrónica donde se puede apreciar aparato de Golgi (G) y retículo endoplásmico (RE) en vecindad a las vesículas de núcleo denso y el núcleo (Nu). Escala, 100 nm.

líneas membranales de aspecto tubular que pueden corresponder a retículo endoplásmico (Fig. 22).

Por las observaciones de la morfología nuclear y de su periferia, pensamos que es posible que las vesículas de núcleo denso que se han reciclado pueden alejarse de sus sitios de liberación y viajar hasta el núcleo. Nuestras observaciones muestran que hay un contacto estrecho entre el núcleo y las vesículas de núcleo denso. Esto podría sugerir que algunas de las sustancias del medio o moléculas membranales, endocitadas junto con las vesículas pueden viajar hasta el núcleo llevando información del medio, para modular la actividad nuclear y en consecuencia, celular.

Tratando de probar esta dinámica para las terminales sinápticas, teñimos células con FM1-43 y seguimos la marca fluorescente en un curso temporal desde el momento de la tinción, hasta 48 horas después (fig. 23). Las neuronas se iluminaron solo por unos segundos y utilizando también filtros de densidad neutra. A las 48 horas de cultivo y observación no se apreciaron datos de daño celular. Al observar estas células, encontramos que a partir de las 24 horas después del cultivo, los sitios de endocitosis teñidos sufrieron una difusión centripeta hacia el centro de la célula, en planos focales donde jamás habíamos visto marca fluorescente. Esto podría correlacionar con la idea que tenemos de la probable migración de las terminales y/o las vesículas sinápticas hacia el núcleo. Es importante hacer notar que este tipo de células son capaces de sobrevivir en cultivo durante una semana o más.

III. POSIBLES ETAPAS EN LA FORMACIÓN DE TERMINALES SINÁPTICAS

Si la distribución de las terminales puede cambiar dependiendo de diversos factores, es interesante conocer cuáles pueden ser las posibles etapas que se suceden antes de que el botón sináptico ocupe su sitio final en zonas específicas de la membrana plasmática.

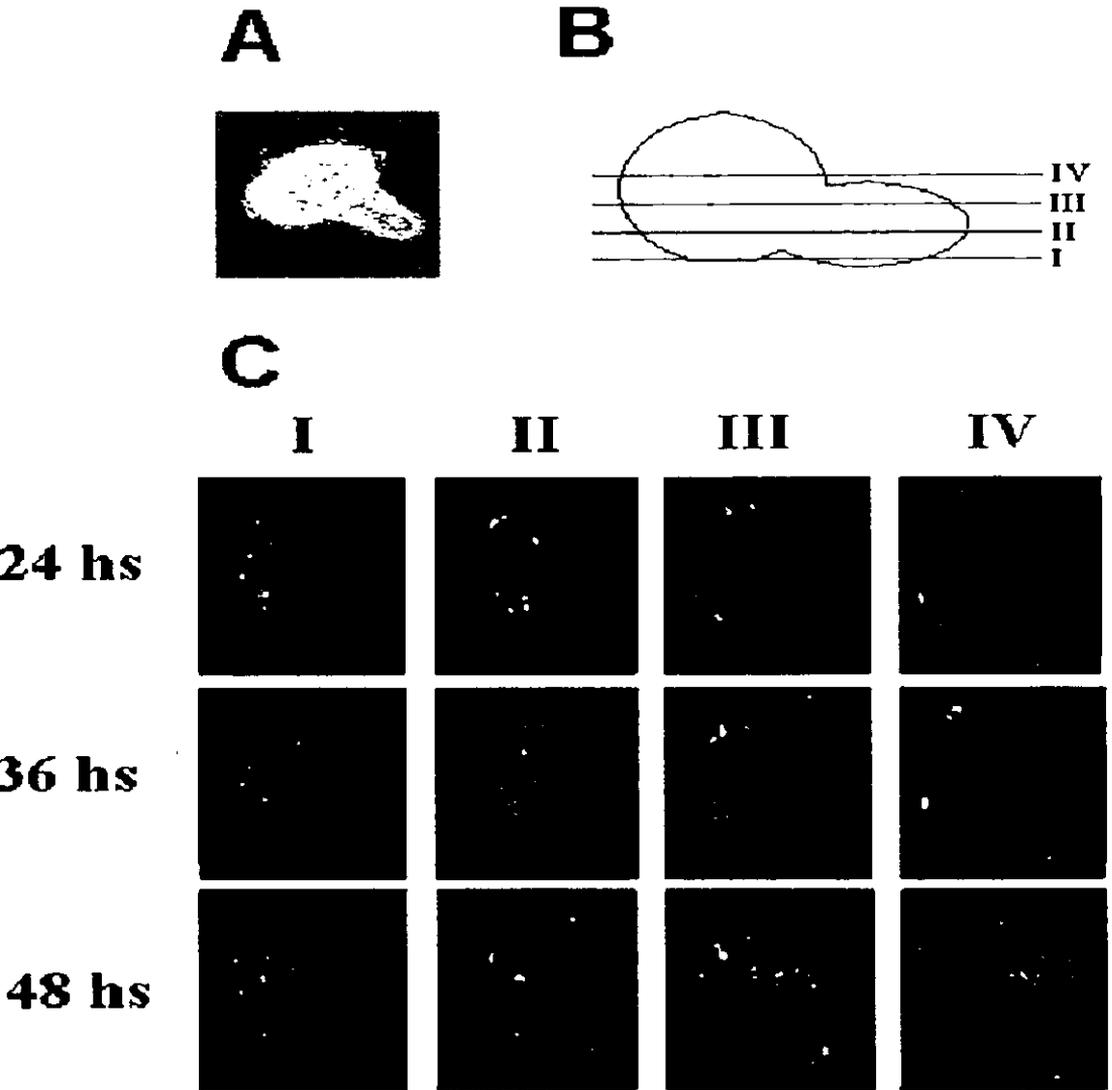


Figura 23. Cortes a diferentes planos focales de una célula teñida con FM1-43 y observada a diferentes tiempos. Los sitios teñidos se internalizaron hacia zonas centrales de la neurona conforme el tiempo avanza y se aprecia tinción en sitios donde a las 24 hs. de cultivo no se apreciaban. La distancia entre cada uno de los cortes es de aproximadamente 8-10 μm . Escala, 10 μm .

Para investigar esto, el primer paso fue reconocer la ultraestructura celular y analizar la morfología de los sitios de liberación. Se realizaron cortes finos de las células y en algunos casos fue posible obtener cortes seriados, incluso de una misma terminal sináptica.

- **Morfología de las terminales sinápticas**

La morfología de las terminales sinápticas en la sanguijuela es similar a la descrita en otras preparaciones (Peters, Palay y Webster, 1991) con vesículas claras adyacentes a la membrana, rodeadas de vesículas de núcleo denso (fig. 24). En cortes de la zona del muñón hemos encontrado vesículas claras, adyacentes a la membrana plasmática, de aproximadamente 40 nm de diámetro y vesículas de núcleo denso de aproximadamente 110 a 120 nm rodeando a las claras, una organización típica de los botones sinápticos. En algunos casos es posible observar también cisternas en la terminal presináptica. Estas estructuras nunca se encontraron en la región del soma. En muchos casos existen en la parte postsináptica abundantes vesículas de núcleo denso de diámetros variables, entre 60 y 140 nm. El diámetro promedio de estas terminales es de 1 μm .

- **Evidencias de etapas previas a la formación de botones sinápticos**

En 4 muestras diferentes, de las cuales en 3 se obtuvieron cortes seriados de una misma terminal, encontramos botones con una morfología muy similar a la descrita previamente, sin embargo, en estos casos las vesículas de la estructura presináptica no se encuentran adyacentes a la membrana sino a una distancia de entre 30 y 80 nm y tienen un arreglo peculiar, esto es, las vesículas claras se encuentran agrupadas en el centro

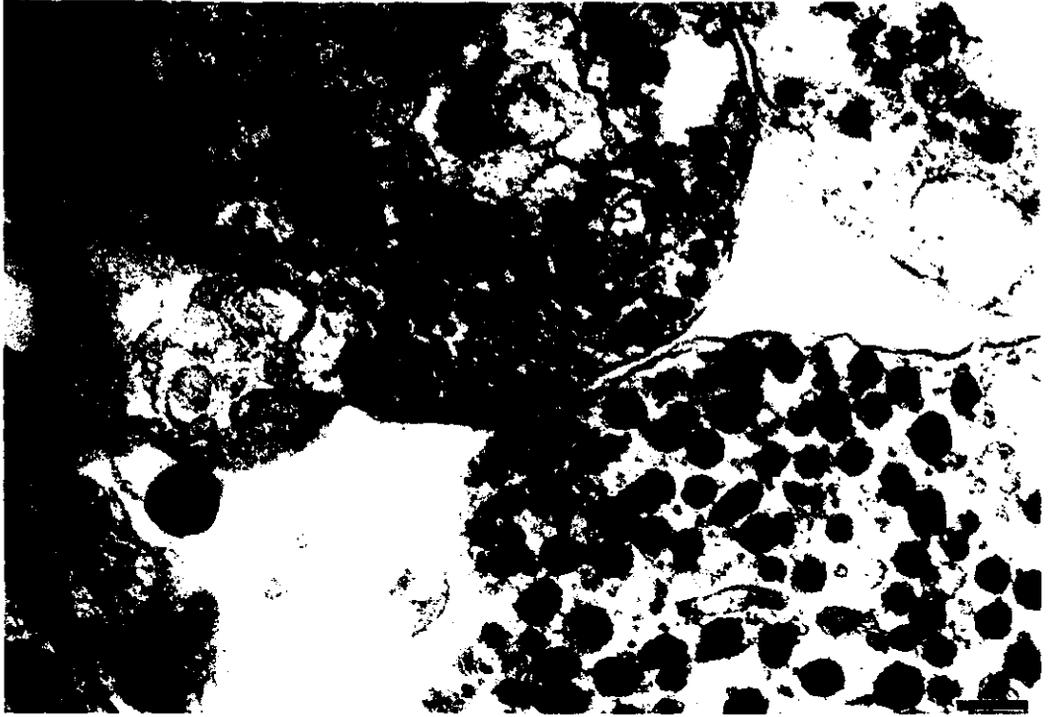


Figura 24. Micrografía electrónica que muestra un botón sináptico en una autopsis en la zona del muñón celular. Se pueden apreciar claramente vesículas claras adyacentes a la membrana plasmática, rodeadas por vesículas de núcleo denso. Escala, 200 nm.

de una esfera donde la corteza está formada por vesículas de núcleo denso. Esto es más evidente en cortes seriados de un mismo cúmulo de estas vesículas (fig. 25).

Estas observaciones sugieren que el botón sináptico es inicialmente una estructura preensamblada dentro del citoplasma y posteriormente ocupa su sitio como un botón funcional en la membrana plasmática de las células de Retzius.

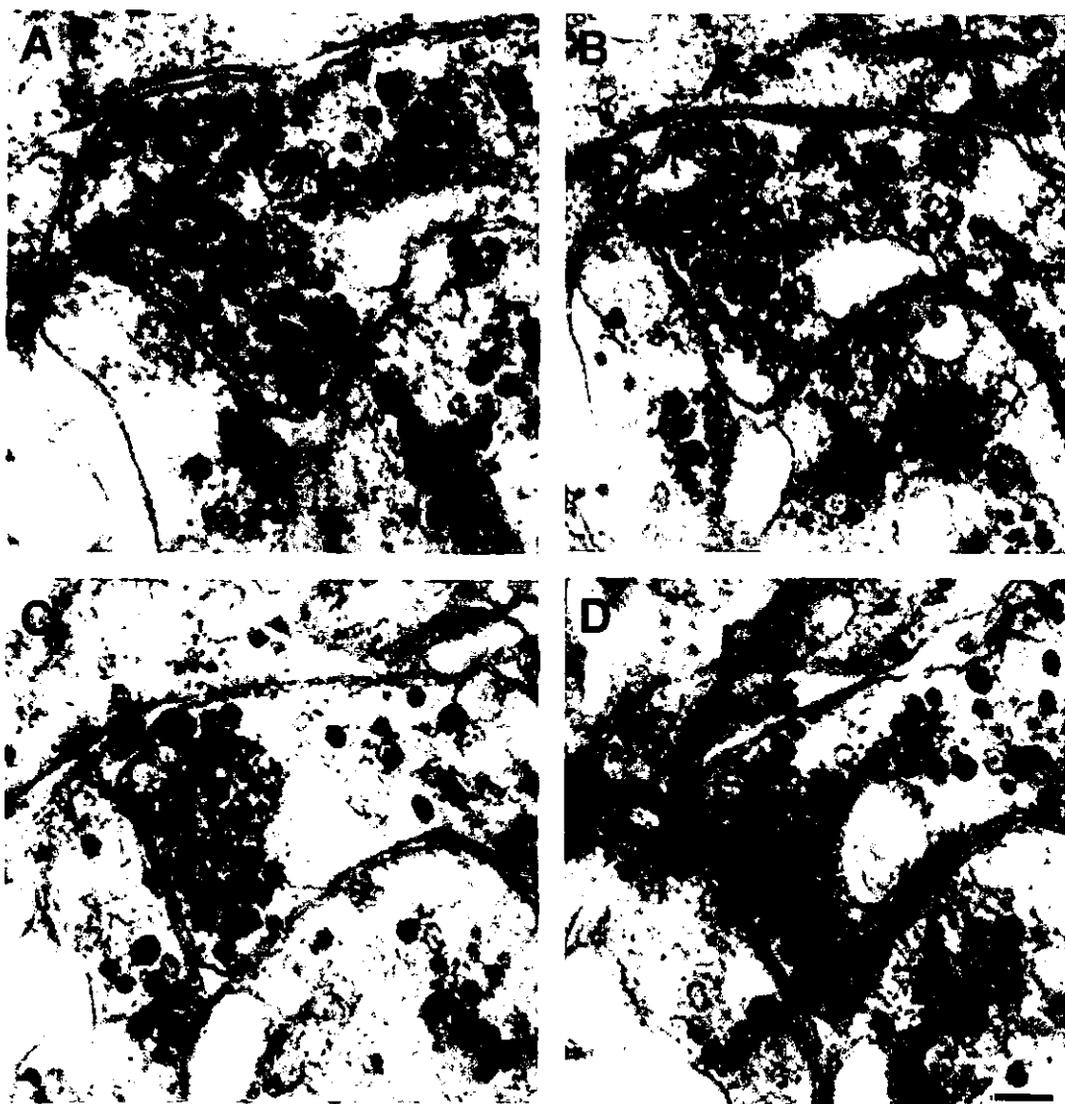


Figura 25. Serie de cuatro micrografías de un mismo botón sináptico. Las vesículas no están adyacentes a la membrana y las claras se encuentran en un núcleo de una esfera delimitada por las vesículas de núcleo denso. Escala 250 nm.

Discusión

- I. Liberación diferencial de transmisor
entre el soma y el muñón
- II. Ciclo vesicular
- III. Formación de terminales sinápticas
a partir de cúmulos de vesículas
preensamblados

DISCUSIÓN

I. LIBERACIÓN DIFERENCIAL DE TRANSMISOR ENTRE EL SOMA Y EL MUÑÓN

Ya hemos mencionado antes que las células de Retzius tienen características de membrana distintas para el soma y para el muñón. Las observaciones ultraestructurales mostraron que solo hay botones sinápticos en el muñón mientras que en el soma existe una gran cantidad de vesículas de núcleo denso. Sabemos además que la serotonina se encuentra tanto en las vesículas claras como en las de núcleo denso (Kuffler, Nicholls y Drappeau, 1987) y que su liberación es dependiente de la frecuencia de estimulación (Bruns y Jahn, 1995).

Como sabemos, una vez que las proteínas han dejado el Golgi, pueden liberarse al exterior por una de dos vías: 1) la regulada, que ocurre cuando la célula es activada por alguna señal específica y 2) la constitutiva, en donde algunas de las proteínas secretadas por el Golgi se dirigen, mediante vesículas de transporte, hacia la membrana celular y se liberan en sitios diferentes a las zonas activas.

Considerando lo anterior podemos pensar que las células de Retzius pueden secretar de manera diferencial en sitios distintos de ella, esto es, de forma regulada en el muñón y sus procesos por medio de sus terminales sinápticas y de manera constitutiva en el soma, considerando la gran cantidad de gránulos que ahí se observan.

El fenómeno constitutivo de exocitosis en la zona del soma celular, favorecería una liberación permanente de 5-HT a partir de las vesículas de núcleo denso de forma independiente a la que se realiza en los botones sinápticos del muñón y neuritas en forma regulada. De modo que la misma sustancia, la serotonina, puede comportarse como neurotransmisor o como neuromodulador u hormona, dependiendo de donde y como se libere. En consecuencia ese comportamiento estaría sujeto al mecanismo de

liberación y su función dependería de en qué sitio de la célula se esté dando esta liberación.

Conocemos cuáles son los efectos fisiológicos que tiene la 5-HT en el animal y sabemos que muchos de sus efectos se ejercen en sitios lejanos a donde se encuentran las células de Retzius que la producen, de modo que una liberación de este tipo, permitiría mantener niveles basales de 5-HT en el animal, como ocurriría en un sistema hormonal simple.

II. CICLO VESICULAR.

- Reciclamiento vesicular

Si la célula tiene estos dos mecanismos de secreción en sitios diferentes y el soma lo hace de modo constitutivo, entonces necesita un abastecimiento importante de vesículas listas para liberar su contenido. Una forma de asegurar esta disponibilidad sería mediante el reciclamiento vesicular.

Tradicionalmente se ha pensado que las vesículas de núcleo denso se forman en sitios lejanos a la terminal y viajan hasta ella por medio del citoesqueleto (Zimmerman, 1993). Últimamente se ha sugerido que pueden también ser internalizadas del modo similar a como lo hacen las vesículas claras (Annaert y cols. 1997). Además Jirkowsky y cols. (1990) encontraron que hay ARNm de oxitocina en las terminales nerviosas de la hipófisis posterior, lo cual podría significar que en la misma terminal existen los factores necesarios para sintetizar ahí mismo nuevo transmisor. El hecho de que existan diferentes tipos de vesículas de núcleo denso, como se observan en este tipo de células, es poco común en otras preparaciones. Pécot-Dechavassine y Brouard (1997) estudiando procesos de exo y endocitosis en la unión neuromuscular, encontraron también varios tipos de vesículas de núcleo denso, basándose, como nosotros, en la densidad de su núcleo. Ellos sugieren que las vesículas que tienen un núcleo más pálido

corresponden a aquellas que se han endocitado. Es posible que estas vesículas puedan, como las claras, reciclarse, por lo que cada vez que se abren al exterior liberan solo una parte de su contenido perdiendo progresivamente su densidad. Así, al endocitarse y reciclarse aparecen cada vez menos densas. Por otro lado, recientemente se han reportado imágenes de vesículas endocitadas, cuyas dimensiones corresponden a las de núcleo denso, pero carecen de densidad, a las que llaman vesículas grandes y que asocian con fenómenos de endocitosis ya que en su membrana aparecen receptores localizados originalmente en la membrana plasmática (Zhang y cols., 1998). En nuestro caso, las vesículas sin densidad aparecen de igual forma en el soma que en el muñón y la imagen de endocitosis de vesícula grande, apreciada en un corte de soma, tampoco tiene interior denso (fig. 11 y 12). De este modo, existe la posibilidad de que además de los procesos de reciclaje conocidos para las vesículas claras, las vesículas de núcleo denso puedan endocitarse nuevamente y reintegrarse a la terminal.

Sin embargo, se necesitaría una maquinaria capaz de reabastecer a las vesículas nuevamente para ejercer su función. Esta maquinaria podrían ser los cuerpos laminados (CL) (Fig. 14). Estas estructuras fueron descritas por primera vez en la década de los 60's en el cuerpo geniculado del gato y han sido encontradas también en muchos otros sitios del sistema nervioso. En sus bordes se conectan con retículo endoplásmico, surgiendo como extensiones del cuerpo laminado. Por estudios histoquímicos se ha demostrado que estos cuerpos contienen proteínas, lípidos y carbohidratos, por lo que se especula que podrían ser sitios de síntesis de péptidos hormonas o alguna otra sustancia (Peters, Sanford, Palay y Webster, 1991). Así, al reciclarse vesículas de núcleo denso, podrían tener un sitio muy cercano a la membrana plasmática donde se reabastecerían de transmisores (Fig. 26).

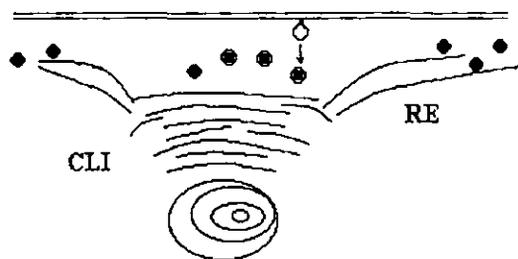


Fig. 26. Cuerpo laminado. En sitios muy cercanos a la membrana plasmática pueden encontrarse este tipo de estructuras que podrían servir como fuente para la síntesis y reabastecimiento de transmisores para las vesículas endocitadas.

Por otro lado algunas de las vesículas, pueden seguir llegando desde el Golgi, transportadas por citoesqueleto, de la forma clásica (Kelly, 1991; Tooze, 1991; Weldon y cols., 1993), tal y como lo muestran nuestras micrografías (fig. 21).

Se sabe que muchas de las señales que son recibidas por la membrana plasmática se internalizan y viajan hasta el núcleo provocando múltiples respuestas. Por las observaciones en las células de Retzius de su morfología nuclear y su periferia, las cuales muestran que hay un contacto estrecho entre el núcleo celular y las vesículas de núcleo denso, pensamos que estas vesículas pueden alejarse de sus sitios de liberación y viajar hasta el núcleo.

Como mostramos al teñir sitios de liberación con FM1-43, algunos de ellos siguen una vía centrípeta desde la membrana, lo cual apoyaría que algunas señales del exterior puedan viajar hacia el núcleo. Sin embargo, la resolución de éste método no nos permite discernir entre estructuras intracelulares, como podrían ser los cuerpos multivesiculares y una sola vesícula endocitada teñida por el colorante. Para ello sería necesario seguir

el curso del material endocitado con marcadores unidos a éste y detectarlos mediante microscopía electrónica.

- **Degradación de las terminales sinápticas**

Si las vesículas de núcleo denso son recicladas, finalmente una terminal debería concluir su ciclo de vida una vez que sus vesículas se han reciclado repetidamente. Lo cual incluye por supuesto la maquinaria molecular que conforma el mecanismo secretor.

Como mencionamos antes, se ha demostrado que los cuerpos multivesiculares pueden ser sitios donde confluyen las vesículas recicladas y donde su contenido y sus membranas se juntan y son degradados, dando el aspecto que observamos en las micrografías. Con base en esto, un botón sináptico podría adentrarse hacia el citoplasma hasta formar cuerpos multivesiculares, en donde las estructuras se degradarían (fig. 15). Se ha sugerido que las vesículas con cubierta son cuerpos multivesiculares en proceso de formación o bien que un número de vesículas pueden confluir entre ellas o con los cuerpos multivesiculares, sumando su membrana a la de estos y descargando su contenido en el interior de los cuerpos multivesiculares. También se ha demostrado que los CMV se pueden teñir con reacciones histoquímicas para fosfatasas ácidas, por lo que algunos los consideran como un tipo de lisosomas secundarios y que están involucrados en la degradación de las membranas de las vesículas sinápticas (Peters, Palay y Webster, 1991). Como hemos descrito, tenemos imágenes que muestran botones sinápticos (fig. 23), conglomerados vesiculares cercanos a la membrana celular (fig.24), cuerpos multivesiculares con vesículas claras y de núcleo denso, cuerpos multivesiculares con restos membranales (fig. 15) y lisosomas (fig 16), de modo que planteamos una posible secuencia de eventos que tienen que ver con la degradación para toda una estructura sináptica que va desde el botón

hasta los lisosomas (fig. 27). Un experimento que probaría esta posibilidad, sería colocar algún marcador extracelular y hacer que éste se endocitara, por ejemplo, peroxidasa acoplada a algún anticuerpo o a oro y buscar los sitios intracelulares en los que se encuentre, siguiendo su curso intracelular.

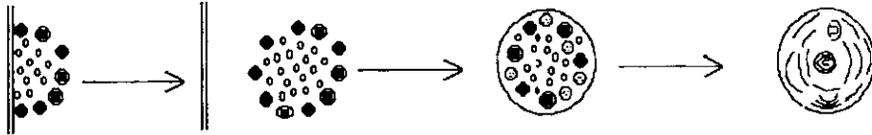


Fig. 27. Degradación de las terminales sinápticas. Las terminales sinápticas podrían internalizarse hacia porciones más profundas en el citoplasma donde sus vesículas confluirían para formar cuerpos multivesiculares y degradar su contenido y sus membranas.

III. FORMACIÓN DE TERMINALES SINÁPTICAS A PARTIR DE CÚMULOS DE VESÍCULAS PREENSAMBLADOS

Como hemos visto, la formación de contactos sinápticos y el sustrato tienen efectos tróficos sobre la distribución de las terminales. Pero ¿Cuáles son los pasos que llevan al establecimiento de un botón sináptico?

Con base en nuestras observaciones morfológicas y los datos de la literatura, planteamos una hipótesis acerca de cómo podría ser la formación las terminales sinápticas. Las vesículas de núcleo denso pueden tener varias densidades en su núcleo y las posibles explicaciones para ello. Una interpretación alternativa, es que posiblemente las menos densas son vesículas inmaduras y que al paso del tiempo, mientras fueran sintetizando o adquiriendo más péptidos y transmisores, su núcleo se condensaría y adquiriría el aspecto completamente denso que caracteriza a las vesículas del tipo I. Además el hecho de encontrar los cúmulos vesiculares, donde las vesículas de núcleo denso encierran a las claras, a muy corta distancia de

la membrana plasmática, nos podría sugerir que se trata de estructuras sinápticas preensambladas en una etapa inmediatamente previa al botón sináptico. Una vez que la terminal ha llegado a esta fase, continuaría su actividad, mediante el reciclaje vesicular (fig. 28).



Fig. 28. Posibles etapas de la formación de un botón sináptico. Los cúmulos vesiculares, como probables terminales sinápticas preensambladas, se dirigen hacia los sitios de liberación en la membrana plasmática.

De esta forma, el modelo completo del ciclo de las vesículas y los botones sinápticos, podría ser como esquematizamos en la figura 29.

Una terminal podría encontrarse en un estado preensamblado y ante un estímulo acercarse hacia su sitio definitivo de liberación. Por otro lado para degradarse al terminar su ciclo vital se internaliza en el citoplasma hasta que pasa a formar parte del aparato lisosomal.

En las terminales activas, pueden haber eventos constantes de endocitosis, no solo de vesículas claras, sino también de vesículas de núcleo denso, las cuales pueden reabastecerse de transmisores o moduladores en los cuerpos laminados, mientras podrían seguir llegando nuevas vesículas desde el aparato de Golgi. Algunas de las vesículas endocitadas, pueden viajar hacia zonas más internas de la célula y alcanzar el núcleo donde podrían llevar algún tipo de información del exterior.

Este proceso aseguraría por un lado, una constante renovación en las terminales sinápticas y por otro, que las señales recogidas desde el exterior puedan ser llevadas hasta el núcleo para regular o adaptar el funcionamiento celular a nuevas condiciones del medio.

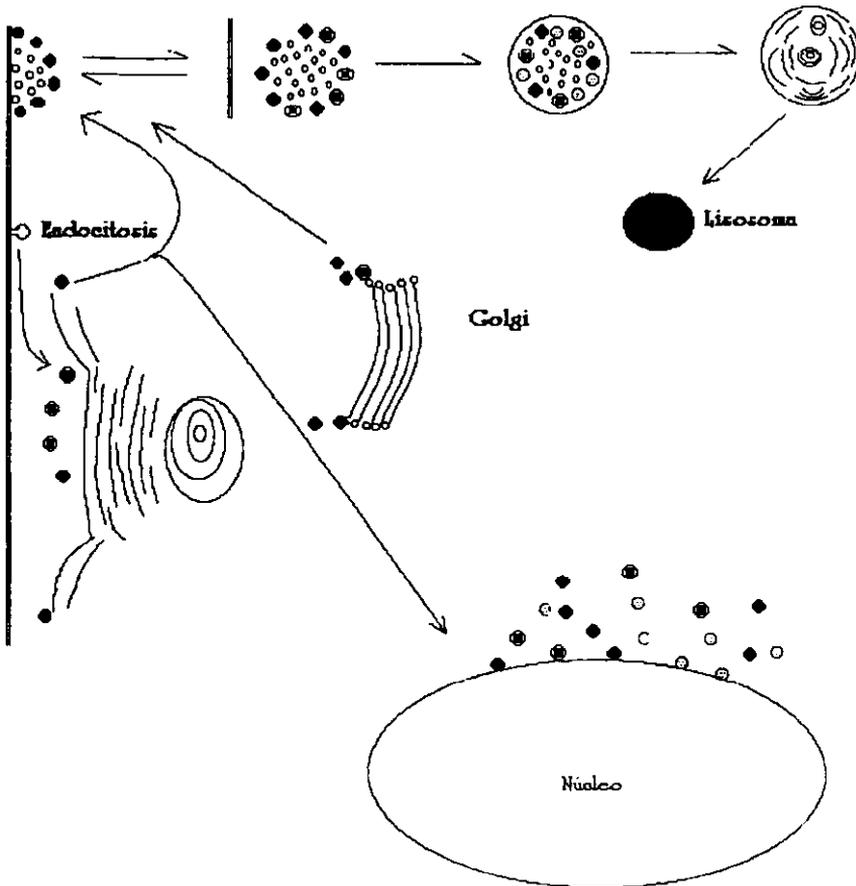


Fig. 29. Esquema que muestra el proceso completo, tanto de formación como de degradación de las terminales y las vesículas sinápticas siguiendo varias vías desde y hacia la membrana plasmática.

Con base en datos morfológicos, proponemos algunos de los papeles que podrían desempeñar las terminales sinápticas y las vesículas de núcleo denso en la dinámica sináptica. Sin embargo, la posible liberación diferencial entre el soma y el muñón y el tránsito centripeto desde la membrana plasmática de las vesículas de núcleo denso, esperan un siguiente paso de investigación, por un lado mediante procedimientos electrofisiológicos con electrodos de fibra de carbono para detectar la liberación diferencial de transmisor por ambos tipos de vesículas y por otro inmunohistoquímicos, promoviendo la internalización de productos extracelulares, identificándolos en las vesículas mediante microscopía electrónica de transmisión y siguiendo su curso intracelular.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La célula puede tener dos mecanismos de liberación distintos en sitios distintos. Es decir, de manera regulada en el muñón y de manera constitutiva en el soma.
2. Las células de Retzius distribuyen de manera diferencial sus botones sinápticos, ubicándolos exclusivamente en la región del muñón.
3. Las vesículas de núcleo denso son más abundantes en el soma que en el muñón.
4. Las vesículas de núcleo denso tienen diferentes características morfológicas y éstas pueden corresponder a distintas etapas en su ciclo de vida.
5. El contacto entre el muñón de una célula de Retzius y el soma de otra origina un cambio en la distribución de las terminales sinápticas.
6. Las estructuras vesiculares esféricas encontradas muy cerca de la membrana plasmática, pueden corresponder a estadios preensamblados de un botón sináptico que con el establecimiento de contactos alcanzan su forma y sitios definitivos inmediatamente previos al establecimiento.
7. La existencia de cuerpos multivesiculares con contenidos que van desde ambos tipos de vesículas sinápticas hasta restos membranales pueden sugerir que se tratan de botones sinápticos internalizados hacia el citoplasma, para pasar a formar parte del aparato lisosomal.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez de Toledo, G., Fernández-Chacón, R y Fernández, J., M. 1993. Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature*. 363: 554-558.
2. Annaert, W. G., Partoens, P., Slembrouck, D., Bakker, A., Jacob, W. y De Potter, W. P. 1997. Rab3 dissociation and clathrin-mediated endocytosis, two key steps in the exo-endocytotic pathway of large dense-cored vesicles in primary cultures of superior cervical ganglia. *European journal of cell biology*. 74: 217-219.
3. Angleson, J. K y Betz, W. J. 1997. Monitoring secretion in real time: capacitance, amperometry and fluorescence compared. *Trends Neurosci*. 20: 281-287.
4. Artalejo. C. R., Elhmdani, A. y Palfrey, H. C. 1998. Secretion: dense-cored vesicles can kiss-and-run too. *Current biology*. 8: R62-R65.
5. Auger, C., Kondo, S. y Marty, A. 1998. Multivesicular release at single functional synaptic sites in cerebellar stellate and basket cells. *Journal of neuroscience*. 18: 4532-4547.
6. Bauerfeind, R., Galli, T. y De Camilli, P. 1996. Molecular mechanisms in synaptic vesicle recycling. *Journal of neurocytology*. 25: 701-715.
7. Betz, W. J. y Angleson, J. K. 1998. The synaptic vesicle cycle. *Annual review of physiology*. 60: 347-363.
8. Betz, W. J., Mao F. y Bewick G. S., 1992. Activiti-dependent fluorescent staining and destining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosciences*. 12: 363-375.
9. Betz, W. J., Bewick G. S., y Ridge, R. M. A. P. 1993. Intracellular movements of fluorescently labeled synaptic vesicles in frog motor nerve terminals during nerve stimulation. *Neuron*. 9: 805-813.
10. Betz, W. J. and Wu. L-G. 1995. Kinetics of synaptic-vesicle recycling. *Current Biology*. 10: 1098-1101.

11. Betz, W. J. y Angleson, J. K. 1998. The synaptic vesicle cycle. *Annual review of physiology*. 60: 347-363.
12. Bruns, D. y Jahn, R. 1995. Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature*. 377: 62-65.
13. Chapman, E. R., Hanson, P. I. y Jahn, R. 1995. The neuronal exocytotic fusion machine: some new developments. *Neuropharmacology*. 11: 1343-1349.
14. Cooper, R. L., Fernández de Miguel, F., Adams, W. B. y Nicholls, J. G. 1992. Anterograde and retrograde effects of synapse formation on calcium currents and neurite outgrowth in cultured leech neurons. *Proceedings of the Royal Society of London*. 249: 217-222.
15. Davis, G. y Goodman, C. S. 1998. Synapse-specific control of synaptic efficacy at the terminals of a single neuron. *Nature*. 392: 82-86.
16. De Camilli, P. y Greengard, P. 1986. Synapsin I: a synaptic vesicle associated neuronal phosphoprotein. *Byochemical pharmacology*. 35: 4349-4357.
17. De Potter, W. P., Kurzawa, R., Miserez, B y Coen, E. P. 1995. Evidence against differential release of noradrenaline, neuropeptide Y and dopamine- β - hydroxylase, from adrenergic nerves in the isolated perfused sheep spleen. *Synapse*. 19: 67-76.
18. De Potter, W. P., Partoens, P., Schoups, A., Llona, I y Coen, E. P. 1997. Noradrenergic neurons release both noradrenaline and neuropeptide Y from a single pool: The large dense cored vesicles. *Synapse*. 25: 44-55.
19. Fatt, P. y Katz, B. 1952. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol*. 117: 109-128.
20. Fernández de Miguel, F., Cooper, R. y Adams, B. 1992. Synaptogenesis and calcium current distribution in cultured leech neurons. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 247:215-221.

21. Fernández-de-Miguel, F. y Drapeau, P. 1995. Synapse formation and function: Insights from identified leech neurons in culture. *Journal of neurobiology*. 27: 367-379.
22. Fesce, R., Valtorta, F. y Meldolesi, J. 1996. The membrane fusion machine and neurotransmitter release. *Neurochemistry international*. 28: 15-21.
23. Fuchs, P. A., Nicholls, J. G. y Ready, D. F. 1981. Membrane properties and selective connexions of identified leech neurones in culture. *Journal of Physiology*. 316: 203-223.
24. Fuchs, P. A., Henderson, I. P. y Nicholls, J. G. 1982. Chemical transmission between individual Retzius and sensory neurones of the leech in culture. *Journal of Physiology*. 323: 195-210.
25. Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J. y Hopkins, C. R. 1996. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *The journal of cell biology*. 132: 1011-1023.
26. Gad, H., Löw, P., Zotova, E., Brodin, L. y Shupliakov, O. 1998. Dissociation between Ca^{2+} -triggered synaptic vesicle exocytosis and clathrin-mediated endocytosis at a central synapse. *Neuron*. 21: 607-616.
27. Guatimosim, C., Romano-Silva, M. A., Gomez, M. V. y Prado, A. M. 1998. Recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction in the presence of strontium. *Journal of neurochemistry*. 70: 2477-2483.
28. Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R. y Heuser, J. E. 1997. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*. 90: 523-535.
29. Haydon, P. H. y Drapeau, P. 1995. From contact to connection: early events during synaptogenesis. *Trends in neurosciences*. 18: 196-201.

30. Henderson, L. P. 1983. The role of 5-Hidroxitriptamine as a transmitter between identified leech neurones in culture. *Journal of physiology*. 339: 309-324.
31. Henderson, L. P., Kuffler, D. P., Nicholls, J. y Zhang, R. 1983. Structural and functional analysis of synaptic transmission between identified leech neurones in culture. *Journal of physiology*. 340: 347-358.
32. Herman, B. y Albertini, D. F. 1984. A time-lapse video image intensification analysis of cytoplasmic organelle movements during endosome translocation. *The journal of cell biology*. 98: 565-576.
33. Hersch, S. M., Yi, H., Heilman, C. J., Edwards, R. H. y Ivey, A. I. 1997. Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra. *The journal of comparative neurology*. 388: 211-227.
34. Heuser, J. E. y Reese, T. S. 1973. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The journal of cell biology*. 57: 315-344.
35. Hökfelt, T., Elfvin, L. G., Elde, R., Schultzberg, M., Goldstein, M. y Luft, R. 1977. Ocurrance of somatostatine-like immunoreactivity in some periferal sympathetic noradrenergic neurons. *Proceedings of the national academy of science. USA*. 74: 3587-3591.
36. Hökfelt, T., Millhorn, D., Seroogy, K., Tsuoro, Y., Ceccarelli, S., Lindh, B., Meister, B., Melander, T., Schalling, M., Bartfai, T y Terenius, L. 1987. Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia*. 43: 768-780.
37. Hökfelt, T. 1991. Neuropeptides in perspective: The last ten years. *Neuron*. 7:867-879.
38. Holtzman, E. 1989. *Lysosomes*. Plenum Press.
39. Iverfeldt, K., Serfözö, P., Díaz Arnesto, L., y Bartfai, T. 1989. Differential release of coexisting of neurotransmitters: frecuency dependence of the efflux of substance P, thyrotropin releasing hormone and [³H]serotonin

- from tissue slices of rat ventral spinal cord. *Acta Physiologica Scandinava*. 137: 63-71.
40. Kaczmarek, L. K. y Levitan, I. B. 1987. Neuromodulation. The Biochemical control of neuronal excitability. *Oxford University Press*.
 41. Katz, B. y Miledi, R. 1967. The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *Journal of physiology*. 189: 407-436.
 42. Katz, B. y Miledi, R. 1968. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *Journal of physiology*. 195: 481-492.
 43. Kelly, R. B. 1991. Secretory granules and synaptic vesicle formation. *Current opinion in cell biology*. 3: 654-660.
 44. Klimashewski, L., Kummer, W. y Heym C. 1996. Localization, regulation and functions of neurotransmitters and neuromodulators in cervical sympathetic ganglia. *Microscopy research and technique*. 35: 44-68.
 45. Kow, L.-M. y Pfaff, D. W. 1988. Neuromodulatory actions of peptides. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 28: 163-188.
 46. Kuffler D. P., Nicholls, J. y Drapeau P. 1987. Transmitter localization and vesicle turnover at a serotonergic synapse between identified leech neurons in culture. *The Journal of Comparative Neurology*. 256: 516-526
 47. Kuno, M. 1995. The synapse: function, plasticity and neurotrophism. *Oxford science publications*.
 48. Kupfermann, I. 1991. Functional studies of cotransmission. *Pharmacological Reviews*. 71: 683-732.
 49. Kuromi, H. y Kidokoro, Y. 1998. Two distinct pools of synaptic vesicles in single presynaptic boutons in a temperature-sensitive *drosophila* mutant, *shibire*. *Neuron*. 20: 917-925.
 50. Liu, Y. y Nicholls, J. G. 1989. Steps in the development of chemical and electrical synapses by pairs of identified leech neurons in culture. *Proceedings of the royal society of London*. 236: 253-268.
 51. Liu, G. y Tsien, R. 1995. Properties of synaptic transmission at single hippocampal synaptic boutons. *Nature*. 375: 404-408.

52. Llinás, R., Steinberg, I. Z. y Walton, K. 1981. Presynaptic Calcium currents in squid giant synapse. *Biophysical Journal*. 33: 289-322.
53. Llinás, R., Sugimori, M., Lin, J.-W. y Cherksey, B. 1989. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86: 1689-1693.
54. Monck, J. R. y Fernández, J. M. 1996. The fusion pore and mechanisms of biological membrane fusion. *Current opinion in cell biology*. 8: 524-533.
55. Muller, K. J., Nicholls, J. G. y Stent, G. S. 1981. Neurobiology of the leech. *Cold spring harbor laboratory*.
56. Murphy, R. F. 1991. Maturation models for endosome and lysosome biogénesis. *Trends in cell biology*. 1:77-82.
57. Murthy, V. N. y Stevens, C. F. 1998. Synaptic vesicles retain their identity through the endocytic cycle. *Nature*. 392: 497-501.
58. Neher, E. 1994. Secretion without full fusion. *Nature*. 363: 497-498.
59. Palade, G. E. y Palay, S. L., 1954. Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anatomical Record*. 118: 335-6
60. Palay, S. L., 1956. Synapses in the central nervous system. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 2 (Suppl.): 193-202.
61. Palfrey, H. C. y Artalejo, C. R. 1998. Vesicle recycled revisited: rapid endocytosis may be the first step. *Neuroscience*. 83: 969-989.
62. Peters A., Palay S. L., y Webster H. 1991. The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells. 3rd. edit. *Oxford University Press*.
63. Peters, A y Palay, S. L., 1996. The morphology of synapses. *Journal of Neurocytology*. 25: 687-700.

64. Pieribone, V. A., Shupliakov, O., Brodin, L., Hüsflker-Rothenfluh, S., Czernick, A. J. y Greengard, P. 1995. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature*. 375: 493-497.
65. Pimplin, D. W., Reese, T. S. Y Llinás, R. 1981. Are the presynaptic membrane particles the calcium channels? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 78: 7210-7213.
66. Ready, D. F. y Nicholls, J. 1979. Identified neurones isolated from leech CNS make selective connections in culture. *Nature*. 281: 67-69.
67. Reid, C. A. Bekkers, J. M. y Clements, J. D. 1998. N and P/Q type Ca²⁺ channels mediates transmitter release with a similar cooperativity at rat hippocampal autapses. *The journal of neuroscience*. 18: 2849-2855.
68. Robertson, J. D., 1953. Ultrastructure of two invertebrate synapses. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 82: 219-23.
69. Rosenmund, C. y Stevens, C. F. 1996. Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*. 16: 1197-1207.
70. Scheutze, S. M, y Role, L. W. 1987. Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptores. *Annual Review of Neurosciences*. 10: 403-457.
71. Schweizer, F. E., Dresbach, T., DeBello, W. M., O'Connor, V., Augustine, G. J. y Betz, H. 1998. Regulation of neurotransmitter release kinetics by NSF. *Science*. 279: 1203-1206.
72. Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. y Rothman, J. E. 1993^a. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318-324.
73. Sollner, T., Bennet, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. y Rothman, J. E. 1993^b. A protein assembly-disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell*. 75: 409-418.

74. Stanley, E. F. 1997. The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face. *Trends in neuroscience*. 20: 404-409.
75. Stevens, C. F. y Tsujimoto, T. 1995. Estimates for the pool size of releasable quanta at single central synapse and for the time required to refill the pool. *Proceedings of the national academy of sciences, USA*. 92: 846-849.
76. Südhof, T. C. 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*. 375: 645-653.
77. Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. y De Camilli, P. 1996 The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *The journal of cell biology*. 133: 1237-1250.
78. Tooze, S. A. 1991. Biogenesis of secretory granules. Implications arising from the immature secretory granule in the regulated pathway of secretion. *FEBS-Lett*. 285: 220-224.
79. Tooze, J. 1991. Secretory granule formation. The morphologist's view. *Cell biophysics*. 19: 117-130.
80. Turek, J. J., Leamon, C. P. y Low, P. S. 1993. Endocytosis of folate-protein conjugates: ultrastructural localization in KB cells. *Journal of cell science*. 106: 423-430.
81. van Deurs, B., Holm, P. K., Kayser, L., Sandvig, K. y Hansen, S. H. 1993. Multivesicular bodies in Hep-2 cells are maturing endosomes. *European journal of cell biology*. 61: 208-224.
82. Wang, C. Y Zucker, R. S. 1998. Regulation of synaptic vesicle recycling by calcium and serotonin. *Neuron*. 21: 155-167.
83. Wacker, I., Kaether, C., Krömer, A., Migala, A., Almers, W. y Gerdes, H. 1997. Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *Journal of cell science*. 110: 1453-1463.

84. Weldon, P., Bachoo, M., Morales, M. A., Collier, B. y Polosa, C. 1993. Dynamics of the large dense-cored vesicles in synaptic boutons of the cat superior cervical ganglion. *Neuroscience*.55:1045-1054.
85. Wittich, B., Volkandt, W. y Zimmerman, H. 1994. SV2 and o-rab3 remain associated with recycling synaptic vesicles. *Journal of neurochemistry*. 63: 927-937.
86. Zhang, X., Bao, L., Arvidsson, U., Eldes, R. y Hökfelt, T. 1998. Localization and regulation of the delta-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey: evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles. *Neuroscience*. 82: 1225-1242.
87. Zimmerman, H. 1993. Synaptic transmission. Cellular and molecular basis. Oxford university press, New York.