

11281
42

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**SECRECIÓN SOMÁTICA Y SINÁPTICA DE
SEROTONINA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Presenta

CITLALI TRUETA SEGOVIA

Tutor: Dr. Francisco Fernández de Miguel

Ciudad Universitaria, México, D. F.

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La Dirección General de Bibliotecas de
se difundir en formato electrónico e impreso el
resultado de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Carla Trujillo

Seguía

FECHA: 19 Mayo - 2003

FIRMA: [Signature]

**A la iaia
y
a la miss**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	7
Comunicación intracelular	7
La serotonina: neurotransmisor, neuromodulador y neurohormona	9
<i>Conducta social</i>	10
<i>Patrones motores</i>	11
<i>Conducta alimenticia</i>	11
<i>Aprendizaje</i>	12
<i>Sistema serotoninérgico en mamíferos</i>	12
<i>Liberación de serotonina</i>	13
Secreción somática en neuronas	14
Sistema nervioso de la sanguijuela	16
<i>La serotonina regula muchas de la funciones y comportamientos vitales de la sanguijuela</i>	18
Las neuronas de sanguijuela en cultivo: una preparación útil en el estudio de la formación y el funcionamiento de las sinapsis	20
<i>La sinapsis Retzius-P</i>	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Cultivo de neuronas de sanguijuela	24
Determinación de la secreción somática: tinción con FM1-43	25
Estimulación de la secreción somática	26
Análisis de la exocitosis somática	27
Análisis del patrón de tinción con FM1-43	27
Experimentos de desteñido y reteñido	28

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Manipulaciones farmacológicas de canales de calcio y de los depósitos intracelulares de calcio	29
Microscopía electrónica	29
Determinación de la secreción sináptica: registro intracelular en las sinapsis en cultivo	30
Dobles tinciones de neuronas de Retzius con rianodina fluorescente y FM1-43	31
Estudio del patrón de disparo de las neuronas de Retzius producido por la estimulación mecanosensorial de la piel	32
Análisis estadístico	32
RESULTADOS	33
I. Secreción somática en neuronas de Retzius	33
<i>Ultraestructura de los sitios de secreción somáticos</i>	35
<i>El número de puntos de FM1-43 depende de la frecuencia de estimulación y de la presencia de Ca²⁺ extracelular</i>	38
<i>Características del patrón de tinción con FM1-43</i>	39
<i>La secreción somática en las neuronas de Retzius es fisiológica</i>	
<i>Sitios de liberación teñidos ante estimulaciones sucesivas</i>	42
<i>Canales de calcio que participan en la secreción somática</i>	43
<i>Participación de las pozas intracelulares de calcio en la Secreción somática</i>	45
II. Liberación sináptica de serotonina en las neuronas de Retzius	49
<i>Participación de los canales de calcio tipo L en la liberación sináptica</i>	54
<i>Papel de la liberación de calcio inducida por calcio en la liberación sináptica de serotonina</i>	56
<i>Co-localización de los receptores de rianodina con los sitios de secreción</i>	57
<i>Papel de la liberación de calcio inducida por calcio en la liberación sináptica de serotonina</i>	58
III. Regulación de la frecuencia de disparo de las neuronas de Retzius por neuronas mecanosensoriales	62
<i>Respuestas simultáneas de las dos neuronas de Retzius del ganglio</i>	63
<i>Correlación entre las respuestas de las neuronas sensoriales y las neuronas de Retzius</i>	64

DISCUSIÓN	65
Secreción somática en las neuronas de Retzius	66
<i>Dependencia de la frecuencia para la secreción somática</i>	69
Secreción sináptica de serotonina	71
Regulación de la frecuencia de disparo por entradas sinápticas a las neuronas de Retzius	75
Posible significado funcional de los distintos modos de secreción en las neuronas de Retzius	77
CONCLUSIONES	79
REFERENCIAS	81

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A Paco, por todo lo que me ha enseñado, por su apoyo y su confianza, por compartir los problemas, los éxitos, las alegrías. Por mostrarme lo divertido que es hacer ciencia y lo importante que es hacerla bien. Por hacer de su vida y de la mía una misma, llena de momentos lindos, de planes y de amor.

A mis compañeros del laboratorio: Mariana, Nuri, Norma, Yuriria, Adriana, Elizabeth, Javier, Hugo y Bruno, por su apoyo de siempre y por compartir conmigo estos años tan importantes de mi vida.

A Bruno Méndez, por su enorme ayuda de todos los días en el laboratorio, por su paciencia y dedicación; por las pláticas, los problemas y las soluciones compartidas, y sobre todo por su amistad.

A Hugo Hernández, Rodolfo Paredes y Jorge Sepúlveda, por el procesamiento de las preparaciones para microscopía electrónica.

A los integrantes de la Unidad de Cómputo del Instituto, y en particular a Francisco Pérez, por su ayuda de siempre con los sistemas de cómputo, que gracias a él son mucho más fáciles de manejar.

A Víctor de Lafuente por su invaluable ayuda en la realización de los ajustes de las funciones matemáticas a los datos experimentales. Por su paciencia e interés, gracias.

A mis co-tutores, Dr. Mauricio Díaz y Dr. David García, por las discusiones a lo largo del desarrollo de este trabajo, por su apoyo y cariño de siempre.

A los revisores de esta tesis: Dra. Marcia Hiriart, Dra. Elvira Galarraga, Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, Dr. Francisco Pellicer, Dr. Jorge Sánchez, Dr. Ranulfo Romo y Dr. Arturo Hernández, por su discusión y comentarios críticos sobre este trabajo.

A Iván, por su gran ayuda en el formato de esta tesis y en los detalles de la vida diaria. Por su cariño y su paciencia y por compartir los buenos y los malos momentos juntos. Te quiero mucho.

A Papá, por estar siempre allí y apoyarme en todo, por aguantar y ayudarme a combatir mi mal carácter, por enseñarme y compartir conmigo las cosas buenas de la vida. Te quiero mucho.

A Mamá y Manuel por quererme mucho, mucho (hay que quererme mucho...) y estar conmigo siempre, en las buenas y las malas, por aguantar mi mal genio y mis neurosis, por compartir mis alegrías, y por enseñarme que la vida es linda y hay que disfrutarla siempre. Los quiero mucho.

A Sara, por estar siempre pendiente de "las celulitas", por sus dibujos, que siempre adornan mi escritorio, por sus juegos, y adivinanzas, sus abrazos, su cariño y por darle todo el tiempo ese toque tan lindo de alegría a la vida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

En este trabajo estudiamos la secreción sináptica y somática de serotonina en una misma neurona y analizamos su dependencia de la frecuencia de disparo y del calcio transmembranal e intracelular. Utilizamos neuronas serotonérgicas de Retzius de la sanguijuela, que en cultivo conservan su identidad y forman terminales presinápticas al entrar en contacto con neuronas sensibles a presión (P). Estudiamos la secreción somática a partir de la incorporación del colorante fluorescente FM1-43 durante la endocitosis que sigue a la exocitosis. Trenes de impulsos producidos por estimulación intracelular en presencia de FM1-43 y de calcio extracelular incrementaron la fluorescencia membranal y produjeron puntos fluorescentes en ella. El número de puntos fue una función sigmoideal de la frecuencia de estimulación. Mientras que diez impulsos a 1 Hz produjeron 19.5 ± 5 puntos por soma, el mismo número de impulsos a 10 Hz produjo 77.8 ± 13.9 puntos. En ausencia de calcio extracelular un tren a 10 Hz sólo produjo 34.0 ± 7.9 puntos por soma. Los diámetros y perfiles de intensidad de los puntos producidos por cada protocolo de estimulación fueron similares. Los puntos se destiñeron al despolarizar las neuronas con 40 mM de K^+ en el medio externo, demostrando exocitosis. Además, los patrones de tinción somática fueron similares en neuronas estimuladas en el ganglio o en cultivo. Micrografías electrónicas mostraron cúmulos de vesículas de núcleo denso en el soma y la ausencia de vesículas claras y zonas densas, características de terminales presinápticas. La secreción somática se abolió al bloquear los canales de calcio tipo L con nimodipina (10 μM), y se redujo en un 42% al bloquear la liberación de calcio inducida por calcio con rianodina (100 μM), mostrando que la secreción somática neuronal tiene un mecanismo similar al de la secreción en células endocrinas excitables.

Para comparar la dependencia de la frecuencia de la secreción somática y sináptica, analizamos las corrientes postsinápticas producidas en sinapsis en cultivo entre neuronas de Retzius y células P. La secreción sináptica se activó con un solo impulso presináptico y se mantuvo estable durante trenes de 10 impulsos a frecuencias hasta de 1 Hz. La eficiencia sináptica se incrementó en función de la frecuencia, con una fase de facilitación rápida a frecuencias entre 1 y 5 Hz que disminuyó a 10 Hz y una segunda fase de incremento lento a frecuencias mayores, que tiende a la saturación. Para estudiar la contribución de las vesículas claras y de las electrodensas a estas respuestas, incrementamos la probabilidad de liberación, aumentando la concentración de calcio extracelular a 10 mM. En estas condiciones, la secreción sináptica se deprimió durante trenes de impulsos entre 1 y 5 Hz, presumiblemente debido al agotamiento de la poza de vesículas claras, y se facilitó entre 10 y 20 Hz, posiblemente por el reclutamiento de vesículas electrodensas. La facilitación se inhibió bloqueando los canales de calcio tipo L con nimodipina, de manera similar a la secreción somática. En contraste, el bloqueo de la liberación de calcio inducida por calcio con rianodina en la sinapsis

abolió la hiperpolarización postpotencial en la neurona presináptica y produjo un alargamiento del potencial postsináptico de 552 ± 174 % sobre el control para impulsos sencillos, 436 ± 168 % para impulsos pareados y 420 ± 105 % para trenes de impulsos a 20 Hz. Esto sugiere que la liberación de calcio inducida por calcio activa una corriente hiperpolarizante que reduce el curso temporal de la secreción de serotonina en la terminal.

Para estudiar las entradas sinápticas y los estímulos fisiológicos capaces de inducir secreción somática, registramos las respuestas a la estimulación de la piel en las neuronas mecanosensoriales del ganglio, simultáneamente con las neuronas de Retzius. La estimulación mecánica de la piel de la sanguijuela produjo potenciales sinápticos y de acción en las dos células de Retzius del ganglio, dependiendo de la intensidad de la estimulación. En algunos casos las ráfagas de impulsos alcanzaron frecuencias promedio hasta de 50 Hz. Las neuronas de Retzius respondieron después de las neuronas sensibles al tacto (T) y de las células P, con quienes correlacionó su actividad sostenida. Nuestros resultados muestran que las neuronas de Retzius liberan serotonina de terminales sinápticas especializadas con efectos locales, y del soma de manera masiva, como células endocrinas, con lo que podrían modular las respuestas de circuitos enteros en el sistema nervioso. La estimulación mecanosensorial es capaz de inducir la secreción somática.

INTRODUCCIÓN

Además de la liberación rápida y localizada de neurotransmisores en las sinapsis, algunas neuronas secretan mensajeros químicos por el soma, los cuales podrían difundir y producir efectos más lentos y menos localizados de neuromodulación. En este trabajo estudiamos cómo una misma neurona regula ambos modos de liberación.

ANTECEDENTES

Comunicación intercelular

En los seres vivos pluricelulares, la comunicación entre las distintas células, tejidos y órganos es fundamental para el funcionamiento del organismo. En los animales existen tres tipos de comunicación intercelular mediados por la liberación de mensajeros químicos, que producen su efecto mediante la activación de receptores específicos en las células blanco. Estas son la comunicación sináptica, la endocrina y la parácrina.

La comunicación sináptica consiste en la liberación de neurotransmisores en sitios especializados muy cercanos a la célula blanco. Dentro de las terminales presinápticas una proporción de las vesículas de secreción está directamente adosada a la membrana y prácticamente en contacto con los canales de calcio (Sheng et al., 1998; Wu et al., 1999; Catterall, 1999), por lo que ante la llegada de un impulso a la terminal presináptica la liberación del neurotransmisor ocurre rápidamente. Además, debido a la cercanía entre las células, la respuesta postsináptica es muy rápida y localizada.

En la comunicación endocrina, las hormonas son liberadas al sistema circulatorio y actúan sobre células en órganos distantes al sitio de liberación. Debido a que el control central del sistema endocrino en los vertebrados es llevado a cabo por neuronas secretoras en el hipotálamo, se habla de comunicación neuroendócrina. Un ejemplo de este tipo de comunicación en los vertebrados ocurre en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, donde las hormonas hipotalámicas son liberadas en el sistema porta hipofisiario para alcanzar células blanco en la hipófisis anterior. A su vez las hormonas producidas por esta glándula son secretadas a la circulación y regulan la producción de gametos y la secreción de hormonas esteroideas en las gónadas, entre otras funciones. Algunas células endocrinas están polarizadas, de manera que la liberación ocurre preferentemente en una región determinada, donde hay canales de calcio acumulados y también se encuentran las

vesículas de secreción (Bokvist et al., 1995; Quian et al., 2001), pero en general no hay zonas activas tan restringidas como en las terminales sinápticas. Además, las vesículas, están a una cierta distancia de la membrana plasmática y no directamente adosadas a ella. La secreción por lo tanto inicia con una latencia mayor (Bokvist et al., 1995), ya que requiere de la difusión del calcio dentro de la célula para movilizar las vesículas y producir su fusión con la membrana. Para lograr esto, las células secretoras requieren del disparo en ráfagas con frecuencias altas que les permitan acumular calcio (Thomas et al., 1990; Ämmälä et al., 1993). Además, las células endocrinas tienen una retroalimentación por la liberación de calcio de depósitos intracelulares que incrementa la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). En algunos casos esta liberación ocurre a través de receptores de rianodina, que se activan por incrementos en la concentración citoplásmica de calcio, efectuando una liberación de calcio inducida por calcio (Lemmens et al., 2001; Kang y Holz, 2003). En otros casos, la activación de receptores acoplados a proteínas G estimula la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), que a su vez activa receptores en el retículo endoplásmico que liberan calcio de dicho depósito (Tse et al., 1997; Tse y Tse, 1999). Los canales de calcio que participan en la secreción endocrina (Mansvelter y Kits, 2000) son por lo general diferentes de los que hay en las terminales sinápticas (Reuter, 1996). Mientras que en las sinapsis predominan los canales tipo P/Q y N, en las células endocrinas predominan los de tipo L.

La comunicación parácrina es intermedia entre las dos anteriores. Ocurre entre células cercanas, pero que no están en contacto directo. En este tipo de comunicación, los mensajeros químicos son liberados al medio extracelular y difunden hacia las células vecinas. Por ello, este tipo de comunicación tiene efectos más lentos, difusos y de mayor duración que la transmisión sináptica y puede modular la actividad de las neuronas circundantes, modificando sus respuestas a las entradas sinápticas que reciben. En la comunicación parácrina, los mensajeros actúan por lo general sobre receptores metabotrópicos de alta afinidad, acoplados a proteínas G. Un ejemplo de modulación parácrina es la que ejercen los neuropéptidos en el sistema nervioso central alterando la liberación de transmisores y las respuestas a la activación de receptores postsinápticos (Fuxe et al., 1994). La comunicación parácrina requiere de la secreción de cantidades mayores de moléculas del mensajero químico que la comunicación sináptica, ya que en la primera éste tiene que difundir en un volumen mucho mayor que el del surco sináptico (Agnati et al., 1995), por lo que la secreción en las terminales presinápticas no parece ser suficiente para explicar este tipo de secreción. Aunque en los axones y dendritas de algunos tipos

neuronales hay sitios de secreción que no parecen hacer contactos sinápticos (Chazal y Ralston, 1987; Moukhles et al., 1997), no está claro dónde se produce la secreción de los moduladores que ejercen acciones parácrinas. Recientemente se ha descrito que algunas neuronas liberan transmisores a partir del soma, que por su superficie membranal parece ser una estructura apropiada para la liberación de grandes cantidades de moléculas en períodos cortos.

Los mensajeros químicos pueden también actuar sobre receptores en la célula que los libera (llamados autorreceptores), ejerciendo una regulación autócrina.

La serotonina: neurotransmisor, neuromodulador y neurohormona

La 5-hidroxitriptamina, o serotonina, es una indolamina que actúa como mensajero químico dentro y fuera del sistema nervioso tanto de invertebrados como de vertebrados. Este mensajero actúa indirectamente mediante la activación de receptores que en su mayoría son metabotrópicos acoplados a la activación de proteínas G. A nivel periférico, la serotonina circula en la sangre y actúa sobre el músculo liso, regulando el tono vascular (Rapport et al., 1948), efecto del que proviene su nombre. También es secretada por el hipotálamo y regula la secreción de prolactina, adrenocorticotropina y hormona del crecimiento en la adenohipófisis (Frazer y Hensler, 1994). En el sistema nervioso central (SNC) la serotonina modula circuitos neuronales responsables de una gran variedad de funciones fisiológicas y conductas. Entre éstas se encuentran la conducta social, incluyendo la agresividad y la depresión, varios patrones motores rítmicos, la alimentación, el sueño, los ritmos circadianos, la conducta sexual, la secreción de hormonas y el aprendizaje. Evolutivamente, la serotonina ha mantenido sus funciones en muchas de estas conductas, como se puede ver en la similitud de sus efectos tanto en invertebrados como en vertebrados (Weiger, 1997). Mientras que en algunos invertebrados se conocen paso a paso los mecanismos de acción de la serotonina, la complejidad del sistema nervioso de los vertebrados no ha permitido tener un conocimiento tan profundo de ellos. A continuación hago una breve revisión de algunas de las conductas moduladas por la serotonina en vertebrados e invertebrados, incluidas la conducta social, los patrones motores, la conducta alimenticia y el aprendizaje. Además de las conductas mencionadas, la serotonina también participa en la regulación de la atención (Jacobs y Azmitia, 1992), de los ciclos circadianos (Prosser et al., 1990), de la conducta sexual (Hull et al, 1999; Weiger, 1997) y de la ansiedad

(Zangarossi et al., 2001; Graeff et al., 1996; Gross et al., 2000). En humanos, las alteraciones en el metabolismo de la serotonina están relacionadas con desordenes conductuales y trastornos neurológicos como los alimenticios, la depresión (Arango et al., 2002), la epilepsia (Jobe et al., 1999), la esquizofrenia (Brieden et al., 2002), o alteraciones de la ansiedad como el desorden obsesivo-compulsivo (Jenike et al., 1996). Aunque los efectos de los fármacos que alteran la transmisión serotoninérgica utilizados en el tratamiento de estos desordenes son bastante claros, los mecanismos por los cuales actúan éstos todavía no se comprenden completamente.

Conducta social

La regulación de la conducta social es una de las funciones de la serotonina que se han conservado a lo largo de la escala filogenética, y se presenta tanto en vertebrados como en invertebrados. Los niveles de serotonina producen cambios en el comportamiento que van desde la agresión asociada a la dominancia social, (Kravitz, 2000) hasta la conducta sumisa y la depresión (Raleigh et al., 1991). En los mamíferos, incluyendo al ser humano, la conducta agresiva y el establecimiento de la dominancia social son modulados por este transmisor (Ferris, 2000; Lesch y Merschdorf, 2000). En los primates, por ejemplo, los individuos tratados con agonistas serotoninérgicos o inhibidores de la recaptura de serotonina muestran comportamientos de afiliación y poca agresividad, y se convierten en dominantes dentro del grupo (Raleigh et al., 1991), mientras que los individuos con una baja actividad serotoninérgica en el SNC (Higley y Linnoila, 1997) o tratados con antagonistas serotoninérgicos, expresan conductas impulsivas, agresivas y de aislamiento social, e invariablemente se convierten en subordinados, llegando incluso a la depresión (Raleigh et al., 1991). Las alteraciones en la transmisión serotoninérgica cambian las conductas agresivas en todos los vertebrados, desde los peces hasta los mamíferos (para revisión ver Weiger, 1997).

La regulación serotoninérgica de la conducta agresiva y el establecimiento de jerarquías sociales ocurre también en invertebrados. Por ejemplo en las langostas que conviven en el mismo espacio, las dominantes presentan una postura erguida con las extremidades flexionadas, que se puede reproducir mediante la inyección de serotonina (Livingstone et al., 1980). En estos organismos se ha estudiado con detalle el circuito que regula esta conducta y se conocen paso a paso los mecanismos de acción de la serotonina (Kravitz, 2000). Algunas neuronas de comando

(Wiersma e Ikeda, 1964) estimulan a dos pares de neuronas serotoninérgicas, que amplifican la señal y activan el patrón motor de flexión de las extremidades, en el que se estimulan las motoneuronas excitadoras de los músculos flexores y las inhibitoras de los músculos extensores, a la vez que se inhiben las motoneuronas inhibitoras de los músculos flexores y las excitadoras de los músculos extensores (Harris-Warrick y Kravitz, 1984). Además, la serotonina se secreta a la hemolinfa desde dos órganos neurosecretores (Kravitz, 1988) y también actúa directamente sobre la placa neuromuscular, incrementando tanto la liberación de neurotransmisor presináptica como la fuerza y duración de las contracciones en los músculos (Glusman y Kravitz, 1982; Goy y Kravitz, 1989; Dixon y Atwood, 1989).

Patrones motores

La serotonina contribuye también a la generación de patrones motores rítmicos como la masticación, la locomoción y la respiración en la rata y el gato (White et al., 1996), facilitando las respuestas de las motoneuronas faciales al glutamato (McCall y Aghajanian, 1979). El sistema serotoninérgico facilita las respuestas motoras a lo largo de toda la escala filogenética (Jacobs y Fornal, 1993; Weiger, 1997). En nemátodos y moluscos por ejemplo, la serotonina actúa como neurohormona regulando la locomoción y dando lugar a distintos comportamientos (Satterlie y Norekian, 1996; Weiger, 1997), y en la sanguijuela, modula al circuito neuronal que coordina el nado (Willard, 1981), el cual describiré con detalle más adelante.

Conducta alimenticia

La ingesta de alimentos también está regulada por la serotonina en vertebrados e invertebrados. En mamíferos, el incremento en la liberación de este transmisor o la inyección intraventricular de inhibidores de su recaptura disminuyen la ingesta, mientras que la inhibición de su síntesis, o la activación de autorreceptores del tipo 5-HT_{1A}, que inhiben el disparo de las neuronas serotoninérgicas, la incrementa (Breisch et al., 1976; Saller y Stricker, 1976), de manera que la serotonina parece inhibir tónicamente la conducta alimenticia. Los efectos hipofágicos de la serotonina se han relacionado con desórdenes alimenticios en humanos, como la anorexia nerviosa (Frazer y Hensler, 1994). La serotonina también regula varios aspectos de la conducta

alimenticia en los moluscos, anélidos y artrópodos (Lent, 1985; Goldburt et al., 1994; Wilson et al., 1996a; Weiger, 1997; Zhang et al., 2000).

Aprendizaje

La serotonina participa en procesos de aprendizaje en algunos invertebrados como los moluscos y anélidos. En *Aplysia californica* la liberación de serotonina de algunas interneuronas sobre las neuronas sensoriales, incrementa la liberación de neurotransmisor hacia las motoneuronas que producen la retracción del sifón y las agallas, causando la sensibilización de este reflejo (Klein et al., 1980; Byrne et al., 1991). La serotonina modula también procesos de aprendizaje en la sanguijuela (Ehrlich et al., 1992; Sahley, 1994), modificando la excitabilidad y la actividad de una serie de neuronas esenciales para dichos procesos en estos organismos, llamadas células S (Burrell et al., 2001, 2002).

La regulación de conductas como las mencionadas anteriormente requiere de la secreción de grandes cantidades de serotonina (Willard, 1981), que permitan que ésta alcance el fluido extracelular en concentraciones suficientes para activar a sus receptores extrasinápticos y actúe de manera parácrina sobre los circuitos neuronales (Bunin y Wightman, 1999). Sin embargo, se desconoce la fuente de la liberación masiva de serotonina capaz de producir efectos generalizados en los circuitos que controlan todas estas conductas.

Sistema serotoninérgico en mamíferos

En los mamíferos, los somas de las neuronas serotoninérgicas se encuentran en 9 grupos neuronales, denominados B₁ a B₉, localizados a lo largo de la línea media del tallo cerebral. Estos corresponden a los núcleos del raphé, aunque hay algunas neuronas serotoninérgicas fuera de estos núcleos (Dahlstrom y Fuxe, 1964). Los axones de las neuronas serotoninérgicas inervan prácticamente todas las áreas del SNC. Los grupos de neuronas serotoninérgicas B₁ a B₅, en los núcleos más caudales del raphé, envían proyecciones descendentes por el tallo cerebral hacia la médula espinal, donde modulan las vías que regulan la percepción del dolor. Los grupos B₆ y

B₇, que constituyen el núcleo dorsal del raphé, el B₈, que corresponde al núcleo medio o central superior, y el grupo B₉, que no es considerado uno de los núcleos del raphé, inervan todo el cerebro, incluyendo la corteza. Junto con proyecciones del locus coeruleus forman parte del sistema activador reticular ascendente, que regula la atención, el control motor y los ciclos de sueño-vigilia, entre otras funciones.

Liberación de serotonina

La liberación de serotonina ocurre por exocitosis. La tasa de liberación de serotonina en las neuronas de los núcleos del raphé depende de la frecuencia de disparo. Estas neuronas tienen además autorreceptores a serotonina, cuya activación disminuye su frecuencia de disparo, y por lo tanto su propia liberación (Frazer y Hensler, 1994). Los mecanismos de liberación de serotonina en terminales sinápticas se conocen a partir de sinapsis entre neuronas cultivadas de sanguijuela, en las que se encuentra tanto en vesículas claras como en vesículas de núcleo denso (Kuffler et al., 1987; Bruns et al., 2000) y su liberación es cuántica, dependiente de calcio (Henderson et al., 1983) y del potencial de membrana presináptico (Dietzel et al., 1986). La disminución del potencial de reposo presináptico incrementa la liberación cuántica, tanto espontánea como evocada por despolarizaciones breves o potenciales de acción. La liberación evocada depende también de la amplitud de la despolarización, de manera similar a la de la sinapsis gigante del calamar (Katz y Miledi, 1967a, b). La liberación presenta facilitación ante pulsos parciales, dependiente de la frecuencia (Dietzel et al., 1986), a pesar de que las corrientes de calcio evocadas por dos despolarizaciones consecutivas son idénticas (Stewart et al., 1989), apoyando la hipótesis del calcio residual (Katz y Miledi, 1968), que postula que la facilitación es producida por la acumulación de calcio dentro de la terminal durante impulsos consecutivos.

Tanto en vertebrados como en invertebrados, algunas terminales serotoninérgicas establecen contactos sinápticos, y liberan serotonina ante la estimulación eléctrica (Bunin y Wightman, 1999). Por ejemplo, en la substantia nigra reticulata casi todos los sitios de liberación hacen contacto con dendritas postsinápticas (Moukhles et al., 1997). Sin embargo, en la mayoría de las áreas del SNC, incluyendo el raphé dorsal y la substantia nigra compacta, hay sitios de liberación en axones y en dendritas, sin evidencia de contactos sinápticos (Chazal y Ralston, 1987; Moukhles et al., 1997).

El tipo de terminales que forman las neuronas serotoninérgicas tiene implicaciones importantes para definir la manera en que la serotonina participa en el procesamiento de información en cada región. Los contactos sinápticos especializados sugieren una asociación fuerte entre la neurona presináptica y su blanco, mientras que la falta de especializaciones sinápticas sugiere un mecanismo parácrino. En concordancia con estos sitios aparentes de secreción extrasináptica, la serotonina en varias áreas del sistema nervioso central, incluyendo el raphé dorsal y la substantia nigra reticulata, se encuentra en el fluido extracelular en concentraciones compatibles con la afinidad de sus receptores. Además, tanto los receptores como los transportadores para serotonina se localizan en sitios extrasinápticos, apoyando que la serotonina puede tener efectos de tipo parácrino (para revisión ver Bunin y Wightman, 1999). Tanto en vertebrados como en invertebrados, la serotonina es secretada además hacia el sistema circulatorio, con lo cual alcanza órganos periféricos, actuando como neurohormona.

La serotonina entonces puede actuar de tres modos distintos: como neurotransmisor en sinapsis especializadas, como neuromodulador en sitios de secreción parácrina, y como neurohormona, cuando es liberada a la circulación. Posiblemente la secreción parácrina es la responsable de la modulación de los circuitos que controlan las conductas mencionadas anteriormente, sin embargo se desconoce la fuente de liberación masiva de serotonina capaz de producir efectos generalizados en estos circuitos. Aunque se ha propuesto que la serotonina puede difundir desde los sitios sinápticos hacia el fluido extracelular (Bunin y Wightman, 1999), y las terminales secretoras que no hacen contactos sinápticos pudieran liberar serotonina de manera extrasináptica (Chazal y Ralston, 1987; Moukhles et al., 1997), la reciente descripción de la secreción somática de otros neuromoduladores (Zaidi y Matthews, 1997, 1999; Puopolo, 2001) abre la posibilidad de que el soma de las neuronas serotoninérgicas participe en su secreción masiva, produciendo efectos parácrinos. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la secreción somática de serotonina.

Secreción somática en neuronas

En los últimos años se ha mostrado que algunas neuronas, tanto de invertebrados como de vertebrados, secretan mensajeros químicos a partir del soma. Dun y Minota (1982) propusieron la liberación somática como responsable de una despolarización posttetánica en

neuronas del ganglio cervical superior y mesentérico de conejo y cobayo, debido a que dicha despolarización es causada por la estimulación intracelular directa de las mismas neuronas y se produce aún después de la denervación preganglionar. Esto fue confirmado más adelante mediante microscopía electrónica (Zaidi y Matthews, 1997; 1999) utilizando ácido tánico para estabilizar el núcleo electrodensito de las vesículas después de su exocitosis. Mediciones de capacitancia en neuronas del ganglio de la raíz dorsal también han mostrado que hay secreción somática de sustancia P en respuesta a la despolarización con alto potasio (K^+). Esta secreción es dependiente de calcio y se activa con concentraciones de calcio intracelular a partir de 0.6 mM, similares a las que activan la secreción en células endocrinas (Huang y Neher, 1996). La secreción somática también se ha mostrado en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, mediante amperometría con fibra de carbono. Esta secreción ocurre en condiciones de reposo y se incrementa por la aplicación local de glutamato, y la entrada de calcio (Jaffe et al., 1998). La dopamina también es secretada a partir del soma de células amacrinas en la retina ante el disparo rítmico de potenciales de acción. Esta secreción es regulada por la activación de receptores extrasinápticos a glutamato, GABA y a la propia dopamina y depende de la entrada de calcio a través de canales de tipo L (Puopolo et al., 2001). En celenterados (Gillis y Anttil, 2001) y en moluscos (Chen et al., 1995), hay neuronas que secretan aminas biogénicas mediante exocitosis dependiente de calcio, tanto a partir de terminales como a partir del soma, mostrando, de nuevo, un mecanismo conservado.

De los datos provenientes de los distintos tipos neuronales que se han estudiado, se puede sintetizar que la secreción somática proviene al menos en parte de vesículas de núcleo denso (Zaidi y Matthews 1997; 1999), parece ocurrir en ausencia de sitios activos y depende de la entrada de calcio (Huang y Neher, 1996) a través de canales de tipo L (Puopolo et al., 2001). Estas características son más similares a las de la secreción endocrina que a las de la transmisión sináptica. Sin embargo, el mecanismo completo de activación y regulación de la secreción somática no ha sido estudiado en una misma neurona, ni se conoce cómo es regulada esta secreción por la actividad eléctrica neuronal o por mecanismos intracelulares. Si una misma neurona puede liberar transmisores tanto de las terminales presinápticas como del soma, es posible que cada compartimento tenga mecanismos de regulación diferentes. En este trabajo estudiamos ambos modos de secreción y su regulación en un mismo tipo neuronal.

Sistema nervioso de la sanguijuela

Este estudio se llevó a cabo en neuronas identificadas del sistema nervioso central de la sanguijuela. Debido al gran tamaño y la accesibilidad de las neuronas así como al número limitado de neuronas en sus circuitos, el sistema nervioso de muchos invertebrados ha sido de gran utilidad para el estudio del funcionamiento básico de las neuronas y sus interrelaciones. El sistema nervioso de la sanguijuela ha sido uno de los más estudiados en neurobiología y ha contribuido a entender algunos aspectos básicos del funcionamiento del sistema nervioso (ver, por ejemplo, Muller et al., 1981). Las ventajas del sistema nervioso de la sanguijuela para estudios de neurobiología provienen del número relativamente pequeño de neuronas que controlan cada función, de sus ganglios estereotipados, de los claros pasos que se siguen en su desarrollo, de la capacidad de regeneración y del repertorio limitado de comportamientos que presenta (Blackshaw y Nicholls, 1995).

Las sanguijuelas son anélidos de la clase Hirudinea en los que cada segmento consta de 5 anillos corporales. Una de las especies más utilizadas para el estudio del sistema nervioso es la sanguijuela medicinal *Hirudo medicinalis*, que por haber sido utilizada en tratamientos médicos desde tiempos antiguos (Payton, 1981a), inspiró los estudios anatómicos de Gustav Retzius y otros anatomistas desde el siglo XIX. Su SNC está formado por una cadena ganglionar que corre por la parte ventral del animal, en la que cada ganglio controla de manera relativamente independiente un segmento del animal. Cuatro ganglios están fusionados en el extremo anterior, formando un ganglio cefálico, y otros siete en el extremo posterior, formando un ganglio caudal que controla la ventosa posterior. Los 21 ganglios intermedios o segmentales están conectados entre sí a través del nervio conectivo y cada uno inerva un segmento a través de las raíces laterales, que se ramifican hacia la periferia (Fig. 1A). Cada ganglio segmental contiene cerca de 400 neuronas, muchas de las cuales (aproximadamente el 75%) han sido identificadas por su función, su patrón de actividad eléctrica, sus transmisores y sus conexiones, además de su forma, tamaño y localización característica en el ganglio. Dentro del ganglio se encuentran los somas neuronales (Fig. 1B), y parte de sus neuritas, que forman el neuropilo. Algunas neuronas envían además prolongaciones a través de las raíces laterales para inervar los órganos internos, la piel, músculos y glándulas en la pared corporal, o bien a través del nervio conectivo, para conectarse con neuronas en los ganglios adyacentes (Payton, 1981b). Cada neurona se repite de un ganglio a otro, de un espécimen a otro, e incluso entre distintas especies. Las neuronas

son monopolares y sus somas tienen diámetros de entre 10 y 80 μm . El gran tamaño de los cuerpos neuronales facilita los registros electrofisiológicos. Las primeras neuronas que fueron identificadas anatómicamente fueron las llamadas células de Retzius, por el anatomista que las describió (Muller et al., 1981). Las primeras en ser funcionalmente identificadas fueron las neuronas mecanosensoriales que responden al tacto (T), a la presión (P) y a estímulos nocivos (N) en la piel (Nicholls y Baylor, 1968), de las que hablaré más adelante.

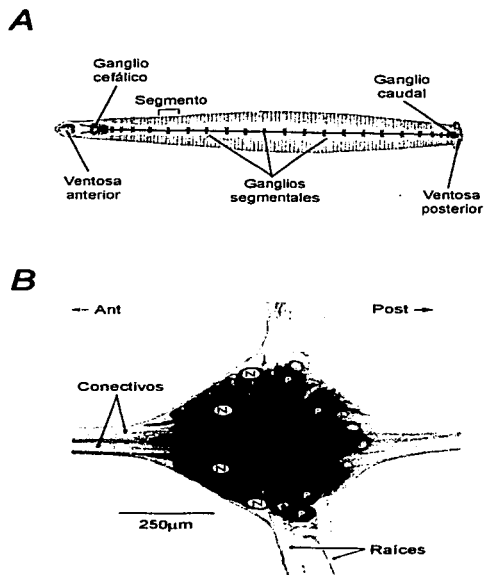


Figura 1. Sistema nervioso central de la sanguijuela. A, Esquema de la cadena de ganglios que forma el sistema nervioso central. El ganglio cefálico y el caudal están formados de varios ganglios fusionados. Cada ganglio segmental inerva un segmento del animal y están conectados entre sí por el nervio conectivo. B, Micrografía de un ganglio donde se observan algunos cuerpos neuronales (tomado de Nicholls y Baylor, 1968).

En la sanguijuela se han estudiado extensivamente el desarrollo del SNC (Weisblat, 1981), la formación y el funcionamiento de las sinapsis serotoninérgicas (Fernández de Miguel y Drapeau, 1995), la regeneración del sistema nervioso después de una lesión (Nicholls, 1987), las propiedades de las células gliales (Kuffler y Potter, 1964; Kuffler y Nicholls, 1966), el funcionamiento de las neuronas y de los receptores mecanosensoriales (Nicholls y Baylor, 1968; Blackshaw y Thompson, 1988; Blackshaw et al., 1988) la conducción de señales en las ramificaciones neuronales (Gu, 1991; Baccus, 1998), los circuitos neuronales que coordinan distintos patrones conductuales y su modulación (Friesen et al., 1976; Willard, 1981; Kristan y Nusbaum, 1983; Nusbaum y Kristan, 1986; Szczupak y Kristan, 1995), así como la codificación de la actividad en poblaciones de neuronas que controlan la respuesta motora a las entradas sensoriales (Lewis y Kristan, 1998).

La serotonina regula muchas de las funciones y comportamientos vitales en la sanguijuela

En los ganglios del SNC de la sanguijuela hay siete neuronas serotoninérgicas, que se pueden identificar por su tinción con el colorante rojo neutro (Lent y Frazer, 1977): las dos neuronas de Retzius, que son las de mayor tamaño en el ganglio y contienen el 50% de la serotonina total en el animal (McAdoo y Coggeshal, 1976), dos pares de neuronas laterales, uno en la parte dorsal del ganglio, también llamadas 21, y uno en la parte ventral, llamadas 61, y una célula en el paquete medial posterior. Las neuronas de Retzius envían axones hacia la periferia a través de las raíces laterales del ganglio, mientras que el resto de las células serotoninérgicas tienen su árbol dendrítico restringido al SNC. Todas estas neuronas reciben entradas sinápticas comunes, aparentemente colinérgicas, y producen actividad sincrónica. Además están acopladas entre sí mediante sinapsis eléctricas débiles que permiten el flujo de corriente tanto despolarizante como hiperpolarizante. Las dos células de Retzius en cada ganglio están acopladas mediante una sinapsis eléctrica, que permite que ambas desaparezcan de manera sincrónica (Lent y Frazer, 1977).

La serotonina regula una gran cantidad de funciones fisiológicas en la sanguijuela, muchas de ellas relacionadas con la conducta alimenticia. Las sanguijuelas hambrientas se ubican por lo general en aguas poco profundas y cuando detectan movimientos en el agua, provenientes de una posible presa, nadan hacia la fuente de las ondas. El nado es coordinado por una serie de interneuronas osciladoras, que estimulan e inhiben de manera rítmica y alternada a las

motoneuronas excitadoras e inhibitoras de los músculos longitudinales ventrales y dorsales de manera progresiva a lo largo de la cadena de ganglios, generando ondulaciones del cuerpo de adelante hacia atrás (Friesen et al., 1976). Las neuronas serotoninérgicas desempeñan un papel fundamental en la iniciación del nado. Las neuronas mecanosensoriales excitan a varias de las neuronas serotoninérgicas, incluyendo las células de Retzius y las 21 y 61, a través de una vía polisináptica (Nusbaum y Kristan, 1986) y éstas a su vez pueden iniciar la actividad del circuito del nado (Nusbaum, 1986). La estimulación de las neuronas de Retzius o la aplicación de serotonina en el baño producen episodios de nado (Willard, 1981), debido a que la serotonina modula la actividad de algunas de las interneuronas osciladoras que inician la actividad rítmica del circuito. Por ejemplo, mediante la modulación de distintos canales de sodio, la serotonina cambia la excitabilidad de una de las interneuronas que inician el ciclo del nado (llamada célula 204), disminuyendo el umbral para que ésta desencadene la actividad del circuito (Angstadt y Friesen, 1993a, b). La serotonina también modula la actividad de las motoneuronas que producen el nado, promoviendo su actividad rítmica alternada (Mangan et al., 1994). Por ello se considera que la serotonina es el factor determinante para la activación del nado. De hecho, la probabilidad de que una sanguijuela nade se correlaciona con la concentración de serotonina en la sangre (Willard, 1981) y en el SNC (Lent y Dickinson, 1984).

Una vez que la sanguijuela encuentra una posible presa, comienza una fase de exploración, durante la cual la actividad de las neuronas serotoninérgicas se incrementa (Wilson et al., 1996a). Cuando los labios sienten una superficie tibia, algunas neuronas serotoninérgicas se activan, disparando trenes de impulsos a altas frecuencias y la serotonina activa la ingesta, estimulando directamente a las glándulas salivales, las mandíbulas y la faringe (Lent y Dickinson, 1984). Durante la ingestión, la serotonina regula la relajación de los músculos de la pared corporal (Sawada y Coggeshall, 1976a, b) y la secreción de moco en la piel (Lent, 1973). La distensión de la pared corporal después de la alimentación hiperpolariza a las neuronas serotoninérgicas y termina la ingestión, produciendo el estado de saciedad, (Groome et al., 1993; Goldburt et al., 1994).

Además de la modulación de todos estos aspectos de la conducta alimenticia, la serotonina modula reflejos como el acortamiento o la flexión local y procesos de aprendizaje en la sanguijuela (Lockery y Kristan, 1991; Ehrlich et al, 1992; Sahley, 1994; Burrell et al., 2001, 2002). La serotonina liberada por las neuronas de Retzius tiene además un efecto

neuromodulador sobre el bloqueo de conducción en las ramificaciones de algunas neuronas (Mar y Drapeau, 1996).

La serotonina en el SNC de la sanguijuela es liberada de terminales sinápticas, ejerciendo un efecto específico y local sobre las neuronas postsinápticas (Nusbaum y Kristan, 1986; Mar y Drapeau, 1996). Sin embargo, la modulación de algunos patrones conductuales, por ejemplo el nado, requiere de la secreción de cantidades muy grandes de serotonina (Willard, 1981), que no se han podido explicar por la liberación sináptica del neurotransmisor y aunque se ha supuesto que proviene de las células de Retzius, se desconoce aún su forma de liberación. El soma de las neuronas de Retzius, con su gran tamaño y contenido de serotonina (McAadoo y Coggeshall, 1976), podría ser una estructura idónea para la secreción masiva de la serotonina responsable de la modulación parácrina de los circuitos mencionados.

Las neuronas de sanguijuela en cultivo: una preparación útil en el estudio de la formación y el funcionamiento de las sinapsis

La capacidad regenerativa del sistema nervioso de la sanguijuela (Baylor y Nicholls, 1971; Jahnsen y Nicholls, 1972), a diferencia del SNC de los vertebrados, permite aislar individualmente neuronas adultas identificadas y mantenerlas en cultivo, en donde sobreviven por semanas, conservando sus características fisiológicas distintivas, como la forma de sus potenciales de acción, la expresión de canales iónicos, y la formación de sinapsis específicas (Fuchs et al., 1981) al quedar en contacto con las neuronas adecuadas. Estas sinapsis se forman cerca del soma, de manera que los registros pre y postsinápticos en éste son un reflejo fiel de lo que ocurre en la sinapsis (Nicholls y Kuffler, 1990). Además, estas sinapsis presentan formas de modulación y plasticidad similares a las del SNC (Fernández de Miguel y Drapeau, 1995).

La sinapsis Retzius-P

Una de las sinapsis mejor estudiadas es la que forman las neuronas de Retzius con las neuronas mecanosensoriales sensibles a presión (células P). El soma de las neuronas de Retzius tiene alrededor de 80 μ m de diámetro, por lo que es muy accesible para registros electrofisiológicos. Estas neuronas pueden ser aisladas fácilmente y si al ser puestas en cultivo

el muñón del proceso primario de una neurona de Retzius queda en contacto con una célula P, forman una sinapsis química inhibitoria similar a la que forman en el ganglio (Fuchs et al., 1982). En esta sinapsis, la célula de Retzius es siempre presináptica (Fuchs et al., 1982; Liu y Nicholls, 1989).

La serotonina produce potenciales sinápticos inhibidores en las células P, mediados por la entrada de cloro. Los potenciales sinápticos tienen un tiempo al pico de aproximadamente 50 ms y una caída bifásica con una constante de tiempo rápida, de 60-100 ms y otra lenta, de 1-2 seg. Hay dos receptores que producen una respuesta directa: uno que produce una respuesta rápida con una constante de tiempo de 10 ms y que se desensibiliza rápidamente, y otro que se activa más lentamente, con una constante de tiempo de 18 ms y no se desensibiliza (Lessman y Dietzel, 1995). Además, un receptor distinto activa corrientes de cloro a través de la activación de la vía de señalización intracelular mediada por AMP cíclico y la cinasa de proteínas tipo A (Sanchez-Armass et al., 1991).

Las neuronas de Retzius tienen también autorreceptores para serotonina, que activan en su mayoría corrientes de cloro, y en una proporción pequeña (10% de la corriente total) canales catiónicos selectivos para iones monovalentes (Lessman y Dietzel., 1991).

Las neuronas de Retzius en cultivo sintetizan serotonina a partir de triptofano o 5-hidroxitriptofano (Henderson, 1983) y la almacenan en vesículas tanto claras como de núcleo denso (Kuffler et al., 1987; Bruns et al., 2000). En las terminales presinápticas de las células de Retzius, las vesículas claras se encuentran en zonas activas formando cúmulos cerca de la membrana presináptica y las vesículas de núcleo denso rodean a éstas, y están más dispersas y alejadas de la membrana (Fig. 2; Kuffler et al., 1987; Nicholls y Kuffler, 1990; Bruns et al, 2000). El soma de las neuronas de Retzius en contraste, contiene principalmente vesículas de núcleo denso (Bruns et al, 2000; H. Hernández, M.A. Morales y F.F. De-Miguel, observaciones inéditas), que pueden liberar su contenido si las células son incubadas con ionomicina (Bruns et al, 2000). Mediante registros amperométricos (Chow, y Von Rüden, 1995) se ha mostrado que las vesículas de núcleo denso liberan 17 veces más serotonina que las claras. Mientras que las vesículas claras liberan aproximadamente 4,700 moléculas del transmisor, las de núcleo denso liberan alrededor de 80,000 (Bruns y Jahn, 1995).

La liberación de serotonina en esta sinapsis ha sido estudiada utilizando 10 mM de calcio extracelular para incrementar su probabilidad y facilitar su registro. La serotonina se libera de manera cuántica y dependiente de calcio (Henderson et al., 1983). Los canales de calcio no están distribuidos homogéneamente en la superficie celular, sino que su densidad es mucho mayor en la punta del muñón, donde se forman las terminales presinápticas (Fernández de Miguel et al., 1992). La liberación de serotonina tiene una fuerte dependencia tanto del potencial de reposo como de la magnitud de las despolarizaciones de la membrana presináptica, y muestra facilitación ante pulsos pareados, la cual depende del intervalo entre los pulsos (Dietzel et al., 1986). Además, la transmisión sináptica presenta depresión con estimulaciones consecutivas a bajas frecuencias (0.5-1 Hz; Fuchs et al., 1982). Sin embargo, no se sabe cómo es la liberación ante trenes de impulsos a distintas frecuencias, ni se ha estudiado la liberación de serotonina en condiciones fisiológicas de calcio extracelular. Tampoco se conoce si la liberación a partir de las vesículas claras y de núcleo denso ocurre de manera independiente, ni la regulación de la transmisión por mecanismos intracelulares.



Figura 2. Terminal sináptica de una neurona de Retzius sobre una célula P co-cultivadas por 5 días. La célula de Retzius (R) tiene un cúmulo de vesículas claras cerca de la membrana presináptica y engrosamientos presinápticos. Las vesículas claras están rodeadas de vesículas de núcleo denso. Frente a las densidades presinápticas la hendidura sináptica es más ancha que en las áreas extrasinápticas. Escala = 0.2 μ m. Tomado de Kuffler et al., 1986.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad moduladora de la serotonina requiere de la secreción de grandes cantidades de moléculas, lo cual no ha podido explicarse con base en la liberación en las terminales sinápticas. El soma neuronal podría ser una estructura adecuada para la secreción parácrina, por su gran superficie membranal. De ser cierto esto, las neuronas podrían liberar serotonina tanto de sus terminales sinápticas como del soma. Dado que en los casos conocidos la secreción somática ocurre en ausencia de zonas activas, de manera similar a la de las células endocrinas excitables, la regulación de la secreción sináptica y somática podría ser distinta.

En este trabajo investigamos si hay secreción somática de serotonina, y si los mecanismos de la secreción somática y la sináptica son distintos. Para ello utilizamos las neuronas de Retzius y estudiamos ambos tipos de secreción de serotonina en un mismo tipo neuronal. Estudiamos 1) la regulación de cada tipo de secreción por la frecuencia de disparo, 2) los canales de calcio membranales que participan en cada una y 3) la participación de la liberación de calcio de los depósitos intracelulares. También estudiamos qué entradas sinápticas en las neuronas de Retzius podrían producir secreción somática.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de neuronas de sanguijuela

Utilizamos sanguijuelas *Hirudo medicinalis* adultas. La cadena nerviosa se aisló en solución salina (en mM): NaCl 120; KCl 4; CaCl₂ 2; tris-maleato 10; el pH fue ajustado a 7.4 con HCl), conservando las raíces de los ganglios segmentales unidas a tejido conectivo para facilitar su sujeción posterior. Las neuronas se aislaron siguiendo el procedimiento de Dietzel et al. (1986), descrito a continuación. Los ganglios nerviosos se mantuvieron en medio de cultivo L-15 (Sigma) complementado con 2% de suero bovino fetal (Gibco) inactivado por calor, 6 mg/ml de glucosa y 0.1 mg/ml de gentamicina. Los ganglios se abrieron por la parte ventral con pinzas finas y se trataron con 2 mg/ml de colagenasa-dispasa (Boehringer-Mannheim) durante 45 a 60 minutos, después de lo cual las neuronas de Retzius y las células P se identificaron visualmente por su localización en el ganglio y su tamaño característico. Las células se aislaron una por una mediante la aplicación de succión a través de una micropipeta de vidrio como se muestra en la figura 3, con lo que se obtiene el soma unido a una parte del proceso primario, al que nos referimos como "muñón". Las neuronas se enjuagaron varias veces con medio estéril para eliminar los detritos y los microorganismos contaminantes, y se sembraron en platos de cultivo, utilizando concanavalina-A (2 mg/ml) como sustrato (Sigma). Para los experimentos de análisis de la secreción somática las células de Retzius se sembraron individualmente, en platos de cultivo con fondo de vidrio. Para los experimentos encaminados a caracterizar las sinapsis, el muñón axonal de la célula de Retzius se colocó tocando el soma de la célula P. La figura 4 muestra una célula de Retzius en cultivo haciendo contacto con una célula P para formar una sinapsis. Los experimentos se hicieron después de 1 a 7 días en cultivo.

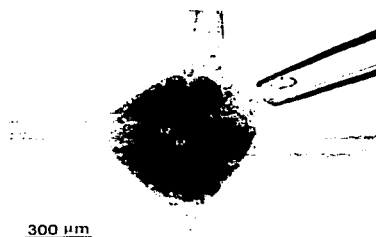


Figura 3. Aislamiento de neuronas identificadas de un ganglio. La pipeta está aislando una célula P. La R indica las neuronas de Retzius.

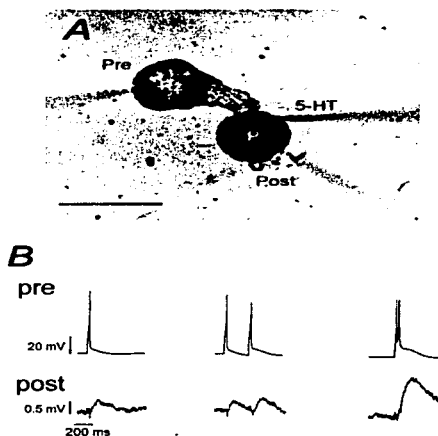


Figura 4. Sinapsis química unidireccional formada entre neuronas identificadas de sanguijuela. A, micrografía de una neurona de Retzius (Pre) formando una sinapsis con una célula P (Post) en cultivo. Se ven los electrodos de registro pre y postsinápticos y un electrodo para la aplicación de pulsos iontoforéticos de 5-HT. B, registro intracelular de las respuestas pre y postsinápticas a la estimulación de la neurona de Retzius. Escala=80 μ m.

Determinación de la secreción somática: tinción con FM 1-43

La excitación somática se analizó usando la incorporación del colorante fluorescente FM1-43 (Molecular Probes; Betz et al., 1992). El FM 1-43 es un fluoróforo con una porción hidrofílica y una lipofílica, que se une a los lípidos de la capa externa de la membrana. En solución acuosa prácticamente no emite fluorescencia, pero al unirse a una membrana fluoresce en 535 nm si es excitado con una longitud de onda de 480 nm. Cuando las vesículas de secreción se fusionan con la membrana ante un estímulo, el fluoróforo se une también a ellas, incrementando la fluorescencia total de la membrana. Al recuperar las vesículas por endocitosis, el colorante queda dentro de ellas y después de lavar el colorante del exterior celular, se pueden ver los sitios donde hubo endocitosis porque las vesículas quedan marcadas con el compuesto fluorescente. Los métodos utilizados para estudiar la secreción somática fueron descritos con detalle (Trueta et al., 2003).

Estimulación de la secreción somática

Se usaron dos protocolos distintos para inducir secreción. El primero consistió en trenes de 10 potenciales de acción producidos por la inyección intracelular de pulsos de corriente despolarizante de 10 ms a frecuencias de 0.5 a 50 Hz, frecuencias que están en el intervalo de disparo fisiológico de estas neuronas (Velázquez-Ulloa et al., 2003). Para ello se utilizaron microelectrodos fabricados a partir de tubos capilares de borosilicato de pared delgada (Frederick Haer and Co.) con resistencias de 18 a 25 MW llenos de una solución de KCl (3M). El FM1-43 (2 μ M) se añadió al medio de cultivo después de penetrar la neurona con el microelectrodo e hiperpolarizarla a -60 mV para evitar su disparo espontáneo. Se esperaron 3 minutos antes de estimular, para permitir la unión del colorante a la membrana celular. Los registros de la actividad neuronal fueron digitalizados por medio de un convertidor analógico-digital Digidata 1200 (Axon Instruments) a una frecuencia de 20 KHz utilizando el programa Pclamp 8 (Axon Instruments) y se almacenaron en una computadora PC. Antes de retirar el electrodo, las neuronas se perfundieron por 2 minutos con solución fisiológica (en mM: NaCl 120; KCl 4; CaCl₂ 2; tris-maleato 10; N-metil D-glucamina 66) en la cual el calcio fue substituido por magnesio para evitar la secreción (Trueta et al., 2003). La N-metil D-glucamina fue utilizada como un osmolito inerte para ajustar la osmolaridad de las soluciones a 330 mosm., similar a la osmolaridad del medio de cultivo. Después de dicho período de lavado, el electrodo se retiró y las células se perfundieron por 8 minutos más con solución fisiológica normal.

El segundo protocolo de estimulación consistió en despolarizar a las neuronas con una solución extracelular con 40 mM de potasio. Para esto, el FM1-43 se añadió a los platos de cultivo con 1 ml de solución fisiológica normal y después de 3 minutos se añadió 1 ml de una solución fisiológica modificada con 76 mM de KCl, substituyendo una cantidad equimolar de NaCl. La mezcla dio como resultado una concentración de 40 mM de K⁺. Las neuronas se incubaron en esta solución por 5 minutos y después el colorante se lavó por perfusión como se describió anteriormente. Como controles, algunas neuronas fueron estimuladas en una solución fisiológica con Mg²⁺ en lugar de Ca²⁺. Otras neuronas se incubaron con FM1-43 en una solución normal (2 mM de Ca²⁺) sin ser estimuladas, o bien se estimularon con alto K⁺ en presencia de Ca²⁺ y en ausencia de FM1-43. La cámara de registro se perfundió en todos los casos por gravedad y el cambio total de la solución dentro de ésta requirió aproximadamente de 30 segundos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis de la exocitosis somática

Para analizar la exocitosis somática, observamos las neuronas con un microscopio Nikon Eclipse TE200, utilizando un objetivo Nikon 100X de inmersión en aceite con distancia de trabajo ultra larga y apertura numérica de 1.25. Para la microscopía de fluorescencia, las células se iluminaron de manera continua con una lámpara de mercurio (Nikon). Se utilizaron filtros de densidad neutral para reducir la intensidad de iluminación en un 90% con el objeto de reducir el blanqueo de la fluorescencia producido por la iluminación y evitar daños a las neuronas. Para adquirir la fluorescencia del FM1-43 se usaron filtros de fluoresceína con pico de excitación a 480 nm y de emisión a 535 nm. Las imágenes se adquirieron por medio de una cámara CCD acoplada a un procesador Argus 10 (Hamamatsu Photonics) programado para integrar de 128 a 256 imágenes cada vez.

Se adquirieron manualmente imágenes secuenciales, aproximadamente cada 5 segundos antes y después de la estimulación con microelectrodos, y se almacenaron en disco duro en forma digital usando el programa Metamorph (Universal Imaging Corporation). La fluorescencia se midió a partir de regiones delineadas manualmente que contuvieran la membrana celular o los puntos fluorescentes (ver más adelante), utilizando el mismo programa. Para medir la intensidad de la fluorescencia en las regiones de interés, el programa se calibró usando las regiones con la intensidad mínima y la máxima de cada célula como los valores de 0 y 255 unidades de la escala de luz respectivamente (escala de 8 bits). La fluorescencia de las regiones de interés se midió por interpolación lineal entre estos 2 valores. Para restar la fluorescencia de fondo, se midió la intensidad en una región que no contuviera la célula y la intensidad en esta región para cada imagen secuencial se le restó a la intensidad de la región de interés de la misma imagen. Los valores de fluorescencia se normalizaron después con respecto al valor inicial obtenido en la primera imagen que se adquirió de cada célula, para hacer comparaciones entre células.

Análisis del patrón de tinción con FM1-43

Después de lavar el FM1-43 del medio externo, las neuronas mostraron un patrón característico de tinción con puntos fluorescentes. Para analizar este patrón, se adquirieron series

de imágenes de las neuronas teñidas en distintos planos focales bajo condiciones calibradas en el eje z. El número de puntos por soma se cuantificó manualmente a partir de las imágenes de planos focales secuenciales utilizando el programa Metamorph, usando criterios que evitaron que se contara más de una vez el mismo punto en imágenes consecutivas (Coggeshal y Lekan, 1996).

El análisis cuantitativo del diámetro de los puntos fluorescentes y de sus perfiles de intensidad se llevó a cabo a partir de series en z de imágenes confocales. Se utilizó un microscopio confocal Bio-Rad para adquirir series de imágenes en planos focales consecutivos separados por 1 mm de distancia, usando los mismos filtros de fluoresceína que se describieron en la sección anterior. Para medir los puntos fluorescentes se trazó una línea recta a través de su diámetro mayor cuando eran asimétricos y se midió la longitud de la línea a partir de una calibración previa obtenida de la imagen original en el microscopio. Para tener una calibración más precisa de las imágenes confocales, se utilizaron microesferas de látex fluorescentes de 0.5 y de 2.0 mm de diámetro (Molecular Probes).

Experimentos de "desteñido" y "reteñido"

Para desteñir los sitios de endocitosis que capturaron FM1-43, las células se perfundieron con solución despolarizante con 40 mM de K^+ y 10 mM de Ca^{2+} . Durante la perfusión, se adquirieron imágenes de fluorescencia cada 5 segundos aproximadamente. A pesar de la utilización de filtros de densidad neutra, la iluminación continua con la lámpara de fluorescencia ocasiona siempre una pérdida gradual de la intensidad de fluorescencia de los fluoróforos, a la que se llama "blanqueo". Para tener un control de la pérdida de fluorescencia por este fenómeno y distinguirlo de la caída de la fluorescencia debida a la exocitosis de las vesículas teñidas con FM1-43, antes de iniciar la perfusión con la solución de alto potasio se adquirieron imágenes secuenciales de la manera descrita pero perfundiendo con una solución con 2 mM de Mg^{2+} en lugar de Ca^{2+} para evitar la exocitosis. La intensidad de los puntos fluorescentes individuales se midió como se describió anteriormente.

Para los experimentos de re-tinción, las neuronas fueron primero teñidas ya sea por estimulación con un tren de 10 impulsos a 20 Hz o por despolarización por 30 segundos con alto K^+ en presencia de FM1-43. Después de adquirir imágenes de fluorescencia de los sitios teñidos,

éstos fueron blanqueados parcialmente por iluminación continua durante 35 segundos utilizando toda la potencia de la lámpara de fluorescencia. Se utilizó el blanqueo en lugar de desteñir las neuronas por despolarización para evitar el agotamiento de la poza de vesículas secretoras disponibles. Las neuronas fueron entonces re-teñidas por medio de otra despolarización con alto K^+ durante 2 minutos para producir una secreción masiva en presencia de FM1-43.

Manipulaciones farmacológicas de canales de calcio y de los depósitos intracelulares de calcio

Para estudiar el papel de distintos canales de calcio, o de la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, en algunos experimentos se utilizó w-Conotoxina MVIIA 2 μM , que bloquea canales de calcio tipo N; FTX 3.3 1 μM , que bloquea canales tipo P/Q; w-Conotoxina MVIIC 1 μM , que bloquea canales tipo Q; PLTX-II 50 nM, que bloquea canales de calcio en insectos (todas las anteriores obtenidas de Alomone Labs.); nimodipina 10 μM (Sigma), que bloquea canales tipo L; rianodina 100 μM (Calbiochem), que bloquea la liberación de calcio inducida por calcio; cafeína 10 mM (Sigma), que activa a los receptores de rianodina; o tapsigargina 200 nM (Calbiochem), que bloquea a la ATPasa de calcio que bombea este ion hacia el interior de los depósitos intracelulares. En todos los casos se preparó una solución en una concentración 1000X en el solvente adecuado (etanol para la rianodina y la nimodipina, DMSO para la tapsigargina, agua desionizada para la cafeína y las toxinas bloqueadoras de canales de calcio). De la solución concentrada se tomaron 3 μl que se disolvieron primero con agitación fuerte en 200 μl de medio de cultivo o de solución fisiológica y posteriormente se añadieron a la cámara de registro con 3 ml de solución fisiológica o de medio de cultivo, para obtener la concentración final adecuada.

Microscopía electrónica

Algunas neuronas de Retzius, tanto aisladas como formando sinapsis en cultivo con células P fueron procesadas para microscopía electrónica. Las neuronas cultivadas se lavaron con una solución amortiguadora de cacodilato 0.08 M (Sigma) y se fijaron por 10 minutos con glutaraldehído al 0.6% (Sigma) y paraformaldehído al 0.4% en solución de cacodilato 0.08 M, pH 7.4, según el procedimiento descrito por Kuffler et al. (1987). Se realizó una post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% (Fluka) en solución de cacodilato. Las neuronas fueron deshidratadas

serialmente e infiltradas con Epon-Etanol (1:1) durante toda la noche. Después de varias substituciones de Epon, éste se polimerizó a 60° por 24 horas. Este procedimiento lo llevó a cabo Victor Hugo Hernández. Se realizaron cortes ultrafinos que se contrastaron con acetato de uranilo por 10 minutos y con citrato de plomo por 2.5 minutos. Los cortes fueron realizados en la unidad de microscopía del Instituto de Fisiología Celular por Rodolfo Paredes y Jorge Sepúlveda. Los cortes se observaron en un microscopio electrónico Jeol 1010 (Jeol USA Inc.).

Determinación de la secreción sináptica: registro intracelular en las sinapsis en cultivo

Para determinar la liberación sináptica de serotonina, se formaron sinapsis en cultivo colocando la punta del muñón de una célula de Retzius en contacto con el soma de una célula P. Los pares Retzius-P se registraron después de 5 días en cultivo para garantizar la formación de la sinapsis. Se utilizaron microelectrodos intracelulares fabricados a partir de tubos capilares de borosilicato (Frederick Haer and Company). Para la estimulación de la neurona presináptica se utilizaron electrodos con resistencias entre 15 y 30 MW llenos con acetato de potasio 4 M. Para el registro de la neurona postsináptica se utilizaron electrodos con una resistencia entre 15 y 20 MW llenos de CsCl₂ 2 M, para bloquear canales de potasio y con ello incrementar la resistencia de entrada de las células y disminuir las corrientes de fuga. La inyección de cloro a la célula permite además invertir y amplificar los potenciales postsinápticos, que en condiciones fisiológicas son inhibidores pero son muy pequeños debido a la cercanía entre el potencial de reposo y el potencial de equilibrio del cloro (Fuchs et al., 1982; Henderson et al., 1983; Liu y Nicholls, 1989). La célula presináptica se registró con un amplificador de registro intracelular con balance de puente (Getting, modelo 5), y la postsináptica se registró en condiciones de fijación de voltaje utilizando un preamplificador igual al descrito, conectado a un módulo de fijación de voltaje (Almost Perfect Electronics), utilizando una frecuencia de muestreo de 2-5 KHz. El potencial de membrana de la célula postsináptica se fijó en -50 mV, que es el potencial de reposo de las células P in vivo y se midieron las corrientes sinápticas en respuesta a la estimulación presináptica. La célula presináptica se estimuló con pulsos de corriente despolarizante utilizando un estimulador Grass SS88. Los registros fueron digitalizados con un convertidor analógico-digital (Digidata 1200, Axon Instruments) a 2-5 KHz, almacenados y analizados utilizando el programa Pclamp 8 (Axon Instruments).

Se estimuló la neurona presináptica con un pulso de prueba que produjo un solo potencial de acción, seguido después de 2 segundos por un tren de 10 impulsos a una frecuencia entre 0.5 y 50 Hz. Entre una estimulación y otra transcurrieron al menos 2 minutos para permitir la recuperación de la poza de vesículas sinápticas disponibles. La respuesta postsináptica se analizó calculando la integral de las corrientes sinápticas producidas por el tren de 10 impulsos y dividiéndola entre la integral de la corriente producida por el pulso sencillo y entre el número de impulsos en el tren (10). Esto da una estimación del índice de eficiencia de la sinapsis, que si es menor que 1 representa depresión sináptica y si es mayor que 1 representa facilitación sináptica.

En la sinapsis Retzius-P la liberación de serotonina en condiciones fisiológicas con 2 mM de Ca^{2+} tiene una probabilidad baja, que aunado a la baja resistencia de entrada de las células dificulta el registro de respuestas sinápticas ante un solo impulso. Por esto, generalmente se incrementa la concentración extracelular de Ca^{2+} y con ello la probabilidad de liberación (ver por ejemplo Ready y Nicholls, 1979; Dietzel et al., 1986; Stewart et al., 1989; Sanchez-Armass et al., 1991). Para poder registrar las respuestas sinápticas en las células P en condiciones fisiológicas de Ca^{2+} extracelular, redujimos la concentración extracelular de cloro de 128 mM a 68 mM, substituyendo equimolarmente el NaCl por Na_2SO_4 y cambiamos el potencial de equilibrio del cloro poniendo KCl en el microelectrodo. Con ello pudimos resolver las corrientes postsinápticas.

Los experimentos con rianodina se realizaron con registro intracelular convencional en ambas neuronas, utilizando electrodos llenos con KCl 3M. La duración del potencial sináptico se calculó a partir del tiempo medio de caída, definido como el tiempo a partir del pico al cual el voltaje ha caído a la mitad de su amplitud máxima.

Dobles tinciones de neuronas de Retzius con rianodina fluorescente y FM1-43

Para examinar la posible co-localización entre sitios de secreción y de liberación de calcio intracelular se realizaron dobles tinciones con bodipy-TR-rianodina y FM1-43. Para ello, se utilizó bodipy-rianodina acoplada a rojo de Texas (Molecular Probes). Se tñieron las neuronas con FM1-43 despolarizando con 40 mM de K^+ de la manera descrita anteriormente. El colorante se lavó del medio por perfusión continua durante 10 minutos y posteriormente se añadió la rianodina al

plato de cultivo en una concentración de 50 nM y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las neuronas durante 10 minutos, cambiando varias veces la solución por solución fisiológica fresca. Las neuronas se observaron en el microscopio confocal utilizando doble filtro de excitación a 488 y 568 nm y doble filtro de emisión a 522 y 680 nm.

Estudio del patrón de disparo de las neuronas de Retzius producido por la estimulación mecanosensorial de la piel

Se aislaron ganglios conectados a la piel por las raíces laterales de un lado (Nicholls y Baylor, 1968). Las preparaciones se sujetaron con alfileres en platos cubiertos con sylgard llenos de solución fisiológica (ver arriba). Las neuronas T, P, N y Retzius pudieron ser identificadas inequívocamente por su tamaño y posición característica en el ganglio, así como por la forma de sus potenciales de acción (Nicholls y Baylor, 1968). La estimulación de la piel se realizó utilizando pinzas de disección para tocar, rozar o pellizcar la piel sin dañarla, mientras se registraban las respuestas de las neuronas mediante registro intracelular convencional.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media \pm el error estándar. A los histogramas de distribución de los diámetros de los cúmulos de vesículas, así como de los diámetros de los puntos fluorescentes se les ajustaron distribuciones gaussianas utilizando el programa Origin 5.0 (Microcal Software Inc.).

Para comparar las medias de más de dos grupos de datos, se utilizó el Análisis de Varianza de una vía. En caso de encontrar diferencias significativas, se realizó una comparación grupo por grupo utilizando la prueba de t de Student. Para comparar sólo 2 grupos se utilizó la prueba de t de Student. En el caso de comparaciones de las mismas neuronas antes y después de un tratamiento, se utilizó una prueba de t pareada. En todos los casos, se consideró una diferencia significativa cuando la probabilidad de error fue menor al 5% ($P < 0.05$).

RESULTADOS

I. Secreción somática en neuronas de Retzius

La secreción somática en las neuronas de Retzius se analizó a partir de la incorporación del colorante fluorescente FM1-43. Un tren de diez impulsos a 20 Hz mediante estimulación intracelular en presencia de FM1-43 produjo un incremento gradual en la fluorescencia de la membrana (Fig. 5). La figura 5D muestra el curso temporal del incremento en la intensidad de la fluorescencia en la membrana de 7 células distintas. Como se ve, antes de la estimulación la intensidad de la fluorescencia fue constante, y se incrementó como resultado de la estimulación de las neuronas con un tren de 10 impulsos a 20 Hz. Después de dos minutos alcanzó un $96 \pm 20\%$ sobre el nivel basal (con un rango entre 50 y 180%; $n=7$), sugiriendo la fusión de

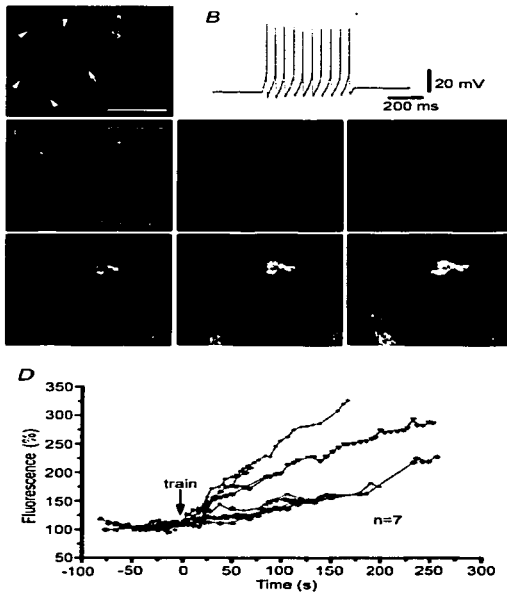


Figura 5. La estimulación eléctrica incrementa la fluorescencia de FM1-43 en el soma de las neuronas de Retzius. A, micrografía de contraste de fases de una neurona de Retzius en cultivo, mostrando el soma (S) unido al muñón (flecha). Las cabezas de flecha señalan neuritas y conos de crecimiento. Escala=60 μm . B, registro intracelular del tren de impulsos a 20 Hz producido por inyección de corriente. C, imágenes de fluorescencia de una región del soma de la misma neurona antes y después del tren a 20 Hz en presencia de FM1-43. El tiempo (segundos) después de la estimulación se muestra en cada imagen. Ocasionalmente, la membrana conservó debris adherido, que se tiñó con FM1-43 (asterisco). Esta tinción inespecífica se excluyó del análisis (Smith y Betz, 1996) y la fluorescencia se midió únicamente en áreas de membrana limpias (cabeza de flecha). Barra de escala=30 μm . D, incrementos en la fluorescencia de áreas seleccionadas de la membrana en 7 neuronas antes y después de la estimulación. Cada símbolo indica datos de una neurona diferente. Tomado de Trueta et al., 2003.

vesículas secretoras con la membrana (Smith y Betz, 1996; Kilic et al., 2001). El incremento en la fluorescencia membranal duró más de 3 minutos en algunas neuronas.

Al perfundir las células con una solución en la que el calcio fue substituido por magnesio para evitar la secreción, la fluorescencia de la membrana disminuyó gradualmente (Fig. 6A y B)

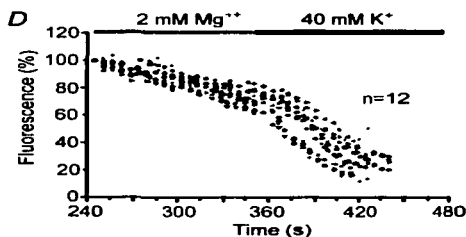
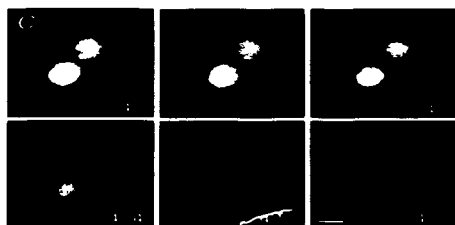
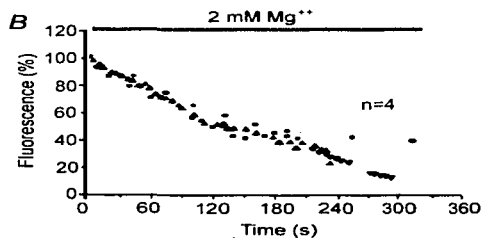


Figura 6. Tinción punteada de la membrana de las neuronas de Retzius.

A, micrografía de contraste de fases de una neurona de Retzius e imágenes fluorescentes de un área seleccionada de la membrana después de la estimulación eléctrica con un tren a 20 Hz en presencia de FM1-43. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas al principio y a los 240 segundos de perfusión con solución con Mg^{2+} . El lavado de la tinción inespecífica de FM1-43 en la membrana permitió ver puntos fluorescentes. Escala: 60 μm (contraste de fases) y 10 μm (fluorescencia). B, decaimiento de la fluorescencia en áreas de la membrana seleccionadas de 4 neuronas durante la perfusión con Mg^{2+} para lavar la tinción inespecífica. Cada símbolo indica datos de una neurona diferente. C, puntos fluorescentes de FM1-43 vistos a diferentes tiempos durante la perfusión con solución con Mg^{2+} (tres imágenes superiores) y durante la despolarización con 40 mM de K^+ y 10 mM de Ca^{2+} (imágenes inferiores). La despolarización en presencia de Ca^{2+} destiñó rápidamente los puntos fluorescentes. El tiempo (seg) en cada imagen es una continuación del mostrado en A y B. Barra de escala=1 μm . D, decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de los puntos durante la perfusión con solución con Mg^{2+} seguida de la despolarización con solución con 40 mM de K^+ y 10 mM de Ca^{2+} . El protocolo de perfusión se muestra arriba. Se muestran datos de 12 puntos en 3 neuronas. Cada símbolo indica datos de un punto diferente. Tomado de Trueta et al., 2003.

debido al lavado del colorante unido a la cara externa de la membrana (Cochilla et al., 1999). Esto desenmascaró un patrón de tinción con puntos fluorescentes bien delimitados, distribuidos en la superficie del soma neuronal (Fig. 6A). Dichos puntos pudieran ser sitios de exocitosis y endocitosis, en cuyo caso, la secreción subsecuente produciría la liberación del colorante capturado en las vesículas (Betz et al., 1992) y por lo tanto los puntos se desteñirían. Para probar esto, cuantificamos la fluorescencia de los puntos durante el lavado con magnesio y después con una solución con 40 mM de K^+ y 10 mM de Ca^{2+} para despolarizar las células y producir secreción. Como se muestra en la figura 6C y D, durante la perfusión con Mg^{2+} la intensidad de los puntos disminuyó lentamente, debido posiblemente al blanqueo de la fluorescencia por la iluminación continua. Sin embargo, al cambiar la solución por una con alto K^+ y alto Ca^{2+} , la intensidad de la fluorescencia de los puntos cayó mucho más rápidamente, y regresó a su nivel basal durante el siguiente minuto (Fig. 6D; $n=12$ puntos de 3 neuronas). Esto sugiere que los puntos fluorescentes corresponden a sitios de exocitosis y endocitosis. El decaimiento de la fluorescencia fue gradual, en lugar de escalonado, sugiriendo que cada punto contenía varias vesículas teñidas (Fig. 6C y D).

Ultraestructura de los sitios de secreción somáticos

Para entender el substrato morfológico de los sitios de secreción teñidos con FM1-43, se observaron al microscopio electrónico secciones ultrafinas de células de Retzius en cultivo. Hubo una diferencia clara entre la ultraestructura del soma y del muñón de las neuronas. El soma contenía vesículas de núcleo denso de aproximadamente 100 nm de diámetro (Fig. 7A; Bruns et al., 2000; V.H. Hernández, M.Morales y F.F. De-Miguel, en preparación), similares a las reportadas en neuronas de Retzius in situ (Coggeshall, 1972; Yaksta-Sauerland y Coggeshall, 1973). Las vesículas de núcleo denso estaban generalmente agrupadas en cúmulos, algunos muy cerca de la membrana o incluso haciendo contacto con ella y otros alejados, en regiones citoplasmáticas (Fig. 7A, B). Los cúmulos incluían vesículas completamente densas, vesículas con núcleo denso concéntrico y, ocasionalmente, vesículas claras grandes (100 nm). En ninguno de los 6 somas neuronales que se estudiaron hubo cantidades apreciables de vesículas claras pequeñas (40 nm) características de los botones presinápticos de estas células (Kuffler et al., 1987).

Los cúmulos de vesículas, medidos a lo largo de su diámetro mayor (ya que por lo general tuvieron formas irregulares), se agruparon en dos clases: aquellos cuyas vesículas más externas

estaban a menos de 150 nm de la membrana plasmática se consideraron superficiales (cabezas de flecha grandes en Fig. 7A), mientras que aquellos cuyas vesículas más externas estaban a una distancia mayor de 150 nm de la membrana se consideraron citoplásmicos (asterisco en Fig. 7B). Los diámetros no tuvieron una distribución normal (Fig. 7C y D). Ajustando una curva gaussiana, los cúmulos superficiales tuvieron una media de 493 ± 35 nm (Fig. 7C), que excluyó los cúmulos con diámetros mayores. Por ello se estimó también la media de los diámetros de todos los cúmulos medidos ($n= 58$), que fue de 630 ± 58 nm. Los cúmulos citoplásmicos tuvieron una

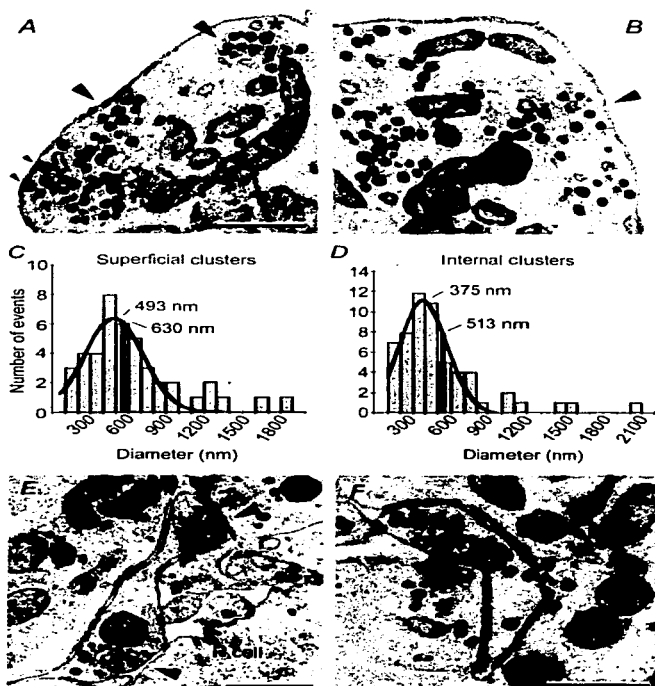


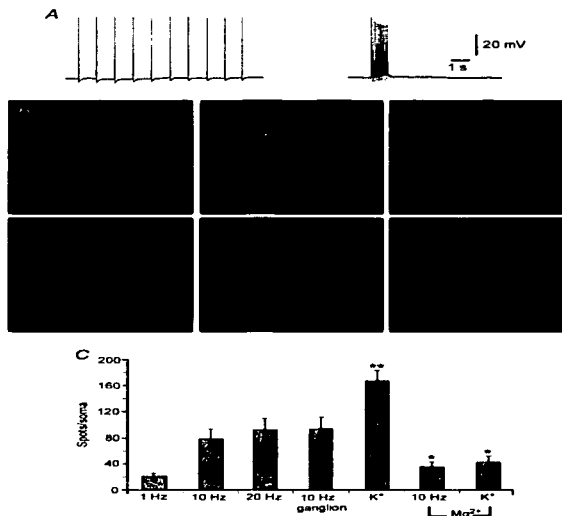
Figura 7. Distribución subcelular de las estructuras secretoras. A, micrografía electrónica que muestra cúmulos de vesículas de núcleo denso (cabeza de flecha) y mitocondrias en el soma de una neurona de Retzius. Los cúmulos cerca de la membrana con vesículas haciendo contacto con ésta se marcan con cabezas de flecha pequeñas. No se encontraron densidades presinápticas. El asterisco marca una vesícula clara grande. B, además de los cúmulos de vesículas cercanos a la membrana, otros cúmulos se encontraron alejados de ésta (asterisco). La escala en A es también para B. C, distribución de los diámetros de los cúmulos superficiales. La línea continua es un ajuste gaussiano a los datos, con una media de 493 ± 231 nm. La línea vertical es el diámetro promedio de toda la muestra. D, análisis similar para los cúmulos a distancias mayores de 150 nm de la membrana celular. E, micrografía de la zona de contacto con una célula P, mostrando un proceso de la neurona de Retzius con dos grupos de vesículas claras y de

núcleo denso cerca de la membrana (cabezas de flecha). F, autapsis formada por un proceso y el muñón de una neurona de Retzius. Se ve una zona presináptica densa con vesículas claras y de núcleo denso (cabeza de flecha) en contacto con la membrana. El asterisco muestra un cúmulo de vesículas en el muñón. Barras de escala = $1 \mu\text{m}$. Tomado de Trueta et al., 2003.

media de 375 ± 24 nm de diámetro, estimada a partir de un ajuste gaussiano, mientras que la media aritmética de toda la muestra ($n=43$) fue de 513 ± 48 nm. En secciones seriadas obtenidas de seis neuronas nunca se encontraron autapsis o terminales presinápticas con vesículas claras pequeñas (30-50 nm) en el soma que pudieran contribuir al patrón de tinción punteado de FM1-43. Las estructuras presinápticas estuvieron restringidas al muñón, en sitios de contacto con neuronas sensibles a presión (Fig. 7E), o en el muñón mismo, formando autapsis (Fig. 7F; ver también Kuffler et al., 1987). La estructura de estos dos tipos de terminales presinápticas fue similar y consistió en cúmulos de vesículas claras pequeñas adosadas a la membrana y rodeadas de vesículas de núcleo denso (Fig. 7E, F; ver también Kuffler et al., 1987).

Figura 8. Dependencia de la frecuencia de disparo y del Ca^{2+} para la tinción con FM1-43.

A, registros intracelulares de trenes de potenciales de acción a 1 y 10 Hz respectivamente, producidos por la inyección de corriente. **B**, patrón de tinción de neuronas estimuladas con diferentes protocolos, indicados en cada imagen. Los patrones de tinción de las neuronas estimuladas en cultivo o en el ganglio fueron similares. Si se substituye el Ca^{2+} por Mg^{2+} se previene la tinción con FM1-43 de las neuronas estimuladas con un tren a 10 Hz o con 40 mM de K^+ . Las imágenes de fluorescencia son no-confocales y fueron tomadas en planos focales comparables entre sí, en el sitio de contacto de la neurona con el fondo del plato. Barra de escala=10 μ m. **C**, cuantificación del número total de puntos por soma bajo las diferentes condiciones de estimulación mostradas en B. Los asteriscos sencillos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a las neuronas estimuladas en presencia de Ca^{2+} . El número de puntos por soma en las neuronas despolarizadas con alto K^+ fue significativamente mayor que el de las neuronas estimuladas con microelectrodos (doble asterisco). Tomado de Trueta et al., 2003.



La presencia de vesículas de núcleo denso en el soma concuerda con las observaciones de Bruns et al. (2000) y sugiere que la secreción somática en las neuronas de Retzius proviene exclusivamente de cúmulos de ellas. Los puntos fluorescentes de FM1-43 podrían corresponder a cúmulos de vesículas teñidas.

El número de puntos de FM1-43 depende de la frecuencia de estimulación y de la presencia de Ca^{2+} extracelular

Para analizar el significado del patrón fluorescente punteado, estimulamos neuronas con trenes de 10 impulsos a frecuencias entre 0.5 y 50 Hz, o con 40 mM de K^+ durante 5 minutos (Fig. 8). El número de puntos fluorescentes en el soma dependió del protocolo de estimulación. Por ejemplo, con 10 impulsos a 1 Hz, se produjeron únicamente 19.5 ± 5 puntos por soma ($n=6$), mientras que el mismo número de impulsos a 10 Hz produjo 77.8 ± 13.6 ($n=8$) puntos, un número significativamente mayor. El incremento de la frecuencia de disparo a 20 Hz produjo 91.5 ± 16.9 puntos por soma ($n=10$), marginalmente mayor al obtenido con 10 Hz. La estimulación con alto K^+ por su parte, produjo 166.8 ± 16.8 puntos por soma ($n=8$), significativamente mayor al número de puntos producido por 20 Hz. La figura 8C muestra la cuantificación de los puntos por soma para todos los protocolos de estimulación descritos en esta sección.

Si los puntos de FM1-43 representan sitios donde ocurren la exocitosis y la endocitosis, entonces su aparición debe ser dependiente de la presencia de calcio extracelular. Para probar esto, algunas neuronas de Retzius fueron estimuladas con trenes a 10 Hz o con alto K^+ en una solución fisiológica en la que el Ca^{2+} fue reemplazado equimolarmente por Mg^{2+} (Fig. 8B). En

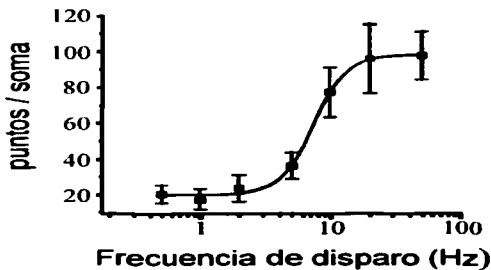


Figura 9. Curva de tinción con FM1-43 en función de la frecuencia de disparo. Número de puntos por soma (media error estándar) en neuronas estimuladas con un tren de 10 impulsos a frecuencias entre 1 y 50 Hz. La línea continua es el ajuste de una función logística a los datos experimentales.

ausencia de Ca^{2+} , la estimulación a 10 Hz o con alto K^+ produjeron únicamente 34.0 ± 7.9 y 41.6 ± 9.9 puntos por soma respectivamente, números significativamente menores a los producidos por las mismas estimulaciones en presencia de Ca^{2+} . La tinción de este número reducido de puntos fluorescentes sugiere que hay una secreción basal, incluso en ausencia de estimulación o de calcio extracelular. La dependencia del Ca^{2+} extracelular apoya la interpretación de que los puntos fluorescentes observados corresponden a sitios de secreción y endocitosis.

Para definir cuantitativamente la dependencia de la frecuencia de disparo para la secreción somática, estimulamos neuronas cultivadas, con trenes de 10 impulsos a frecuencias entre 0.5 y 50 Hz, en el intervalo fisiológico de disparo de estas neuronas (Lent y Frazer, 1977; Velázquez-Ulloa et al., 2003). El número de puntos de FM1-43 por soma fue función de la frecuencia de disparo, de manera que la estimulación con 10 impulsos a 0.5 y 1 Hz produjo 20.8 ± 5.1 y 19.5 ± 5.1 puntos por soma respectivamente, el intervalo dinámico estuvo entre 2 Hz (24.0 ± 7.5 puntos) y 10 Hz (77.9 ± 13.9 puntos), y entre 20 Hz (96.5 ± 19.3 puntos) y 50 Hz (98 ± 13.5 puntos) la respuesta no creció, sino que hubo saturación (Fig. 9). Los datos se ajustaron empíricamente a una función sigmoideal de la forma:

$$y = \frac{20.36 - 98.61}{1 + \left(\frac{f}{3.36}\right)^{7.38}} + 98.61$$

donde y es el número puntos por soma y f es la frecuencia de disparo.

El número de puntos obtenidos con frecuencias menores a 5 Hz fue similar al basal producido por estimulación a 10 Hz en presencia de Mg^{2+} . El número de puntos fluorescentes por soma, entonces, parece representar la cantidad de secreción que ocurre con la estimulación, y es dependiente de calcio y de la actividad eléctrica. El alto coeficiente de Hill (7.38) sugiere que la secreción somática está regulada de manera cooperativa por varios factores (ver discusión).

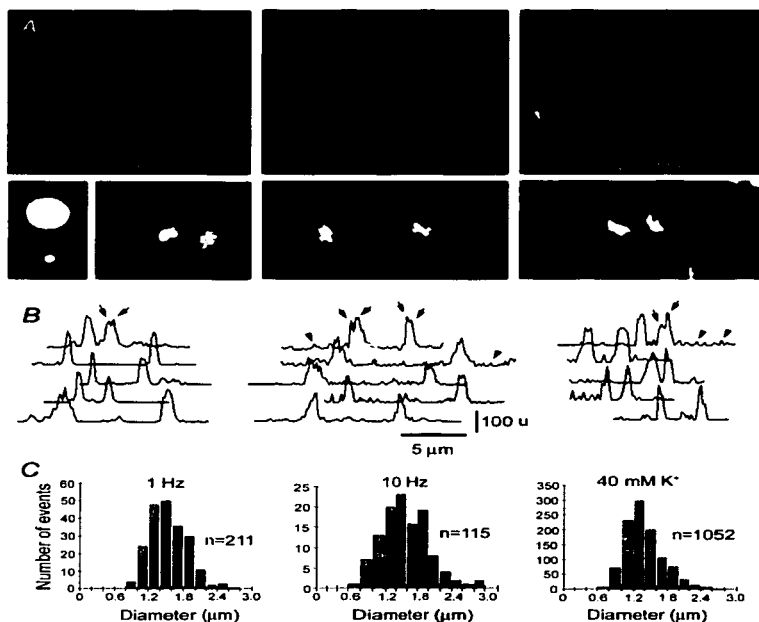
Características del patrón de tinción con FM1-43

La dependencia del número de puntos fluorescentes con la frecuencia de estimulación sugirió que el número de puntos podría reflejar la cantidad de exocitosis y la subsecuente endocitosis producidas por cada estimulación. Para probar esta posibilidad, analizamos si las características de los puntos eran las mismas bajo las diferentes condiciones de estimulación. Las neuronas se estimularon con trenes de 10 potenciales de acción a 1 ó 10 Hz, o fueron despolarizadas

durante 5 minutos con 40 mM de K^+ , pero esta vez los puntos fluorescentes se observaron con microscopía confocal en condiciones calibradas. Las reconstrucciones tridimensionales en la figura 10A, muestran que el número de puntos fluorescentes fue determinado por el protocolo de estimulación de manera similar a lo ya descrito. Mientras un tren de 10 impulsos a 1 Hz produjo solamente algunos puntos fluorescentes, el mismo número de impulsos a 10 Hz o la despolarización con K^+ produjeron un patrón de tinción profuso. Sin embargo, las características de los puntos fueron similares en los tres tipos de estimulación. La figura 10A muestra también la amplificación de algunos puntos fluorescentes producidos por cada protocolo de estimulación

Figura 10. Patrón de tinción de las neuronas de Retzius con FM1-43.

A, superposición de imágenes confocales de neuronas de Retzius estimuladas en presencia de FM1-43. El protocolo de estimulación se muestra en cada imagen. La flecha apunta al muñón neuronal. Barra de escala=30 μ m. Abajo se muestran imágenes confocales amplificadas de microesferas fluorescentes de 2.0 y 0.5 μ m de diámetro y puntos de FM1-43 de neuronas estimuladas con cada protocolo. Nótese la asimetría de los puntos. B, perfiles de intensidad de luz de varios puntos en cada una de las neuronas mostradas arriba. Los trazos superiores corresponden a los puntos mostrados en las imágenes. Se observaron comúnmente diferentes picos en cada punto (flechas). Las intensidades están en una escala de grises arbitraria de 256 unidades (u). Nótese el incremento en el ruido basal en los perfiles de las neuronas estimuladas a 10 Hz y con alto K^+ (cabezas de flecha). C, histogramas de distribución de los diámetros de los puntos de FM1-43 obtenidos de imágenes confocales de distintas células estimuladas con cada protocolo. Tomado de Trueta et al., 2003.



así como imágenes de microesferas fluorescentes de 0.5 y 2.0 μm de diámetro con propósitos de calibración. Los puntos fluorescentes fueron asimétricos y de intensidad no homogénea. En muchos casos, los perfiles de intensidad luminosa de puntos individuales tuvieron más de un pico (flechas en Fig. 10B), sugiriendo que cada punto contenía varias vesículas, pero los valores máximos de estos perfiles en una misma neurona y en neuronas estimuladas con diferentes protocolos fueron similares (Fig. 10B). Entre los puntos bien delimitados, hubo pequeños picos fluorescentes, que destacaron del ruido de fondo de los perfiles de intensidad (cabezas de flecha en Fig. 10B). Suponemos que estas fluctuaciones se deben a la tinción de vesículas aisladas, aunque la resolución de nuestro sistema de imágenes limitó el análisis de este componente, por lo que en adelante me referiré únicamente a los puntos fluorescentes ya descritos.

Los diámetros de los puntos de FM1-43 también fueron similares en neuronas estimuladas con distintos protocolos. La medición del diámetro mayor de los puntos fluorescentes dio lugar a las distribuciones gaussianas mostradas en la figura 10C. Los puntos en las neuronas estimuladas a 1 Hz, 10 Hz y con alto K^+ tuvieron una media de $1.34 \pm 0.58 \text{ mm}$ ($n=211$), $1.36 \pm 0.45 \text{ mm}$ ($n=115$) y $1.16 \pm 0.35 \text{ mm}$ ($n=1052$) respectivamente, diferencias no significativas ($p>0.05$). Como el diámetro de las vesículas somáticas es de 100 nm (Bruns et al., 2000), los diámetros de los puntos fluorescentes apoyan que éstos pueden haber sido producidos por grupos de vesículas, y no por vesículas individuales.

La secreción somática en las neuronas de Retzius es fisiológica

Para investigar si la secreción somática de las neuronas de Retzius ocurre in situ, es decir, en su localización habitual en el sistema nervioso, es decir, es fisiológica, estimulamos 7 neuronas con trenes a 10 Hz in situ, dentro de los ganglios nerviosos, en presencia de FM1-43. En este experimento la relación señal/ruido de las imágenes fluorescentes se vió afectada por la unión inespecífica del colorante en el ganglio. Por ello, y para mejorar las condiciones ópticas y obtener imágenes comparables con las de las neuronas cultivadas, las neuronas fueron aisladas después de la estimulación, en una solución con Mg^{2+} para evitar la pérdida de la tinción por secreción, y fueron sembradas en platos con fondo de vidrio para observarlas al microscopio de fluorescencia. Todas ellas tuvieron un patrón de tinción similar al de las neuronas estimuladas en cultivo, con una media de 92.3 ± 18.5 puntos por soma (Fig. 8B, C).

Sitios de liberación teñidos ante estimulaciones sucesivas

Para analizar si los sitios de secreción teñidos son zonas activas membranales en lugares fijos, o si la secreción ocurre de manera difusa en sitios al azar, estimulamos células de Retzius con alto K^+ por 30 segundos en presencia de FM1-43 y observamos planos focales con puntos fluorescentes (Fig. 11A). La fluorescencia fue entonces blanqueada por iluminación continua

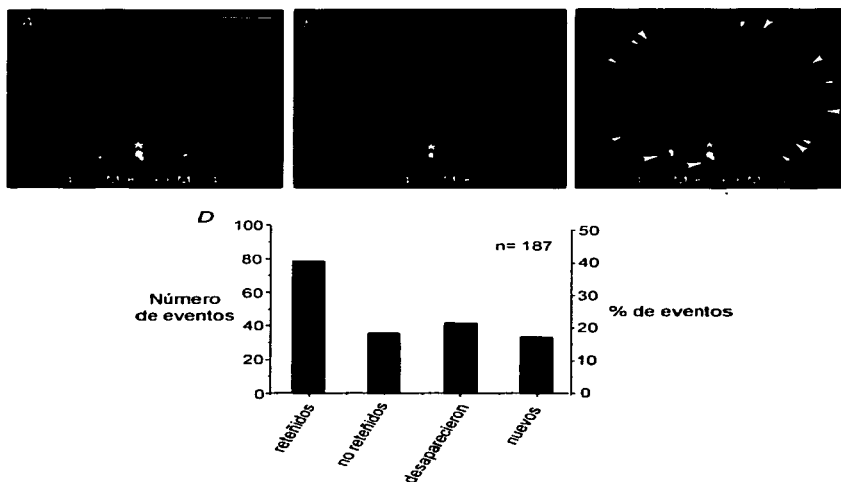


Figura 11. Re-tinción de los puntos fluorescentes. A, imagen de fluorescencia de una neurona de Retzius teñida por despolarización con 40 mM de K^+ con 10 mM de Ca^{2+} por 30 segundos en presencia de FM1-43. El asterisco marca un punto inespecífico usado como referencia del plano focal. La flecha gris apunta a un punto que no se re-teñió en C, aunque permaneció en el mismo sitio. B, mismo plano focal después de blanquear la fluorescencia por iluminación directa con la lámpara de fluorescencia. Nótese la disminución de la fluorescencia de los puntos. C, mismo plano focal después de volver a teñir por despolarización durante 2 minutos en presencia de FM1-43. Nótese que algunos de los puntos se volvieron a teñir (cabezas de flecha grandes). Las cabezas de flecha pequeñas indican sitios donde desaparecieron puntos previamente teñidos y las flechas indican puntos nuevos que no habían aparecido anteriormente. D, número (escala izquierda) y porcentaje (escala derecha) de puntos que se re-teñieron, no se re-teñieron pero permanecieron en el sitio, desaparecieron y aparecieron nuevos con la segunda estimulación. Escala = 20 μm .

durante 35 segundos usando toda la potencia de la lámpara de fluorescencia. Esto disminuyó la intensidad de los puntos, pero permitió que siguieran visibles (Fig. 11B). Aunque los puntos se podían desteñir estimulando con alto potasio, preferimos blanquear los puntos, para evitar que las vesículas secretoras de la célula se agotaran, ya que los niveles de secreción producidos por la despolarización son enormes. Las células fueron entonces re-teñidas con 2 minutos de despolarización con alto K^+ en presencia de FM1-43. Como se muestra en la figura 11C, el 41% de los puntos que se habían observado originalmente se volvieron a teñir (cabezas de flecha grandes), el 18% permanecieron en el mismo sitio pero no se re-teñieron (ver flecha gris en Fig. 11A), el 21% de los puntos originales desaparecieron (sitios señalados por las cabezas de flecha pequeñas) y además, aparecieron nuevos puntos en sitios donde antes no los había (17% de los puntos totales; flechas blancas; Fig. 11D). Esta dinámica de re-tinción mixta sugiere que algunos cúmulos vesiculares liberaron, endocitaron y volvieron a liberar en el mismo sitio, mientras que otros nuevos fueron reclutados y otros más, internalizados.

Canales de calcio que participan en la secreción somática

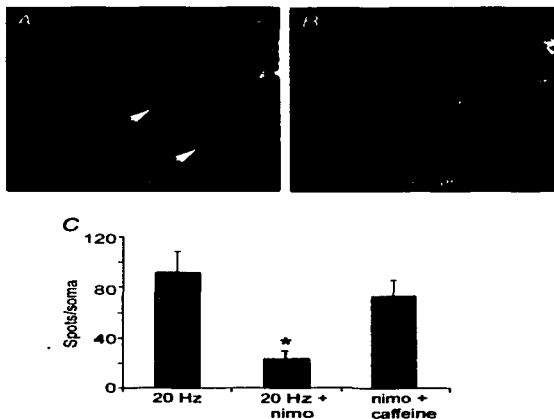
La dependencia de la frecuencia de disparo para la secreción somática de serotonina apoya que ésta es similar a la secreción en células endocrinas (Åmmälä et al., 1993), pero distinta que la liberación en la sinapsis (Fuchs et al., 1982). Para incrementar la evidencia acerca de la similitud entre la secreción somática neuronal y la endocrina, analizamos la posible mediación de los canales tipo L, cuya contribución es común en la secreción endocrina, pero poco convencional en la sináptica. Para ello estimulamos 12 neuronas de Retzius con trenes de 10 impulsos a 20 Hz en presencia de nimodipina, un bloqueador de canales de calcio tipo L (Fig. 12). En estas condiciones, la estimulación produjo 22.9 ± 6.4 puntos por soma ($n=12$; Fig. 12A, C), significativamente menor (75%) que el número de puntos producidos en ausencia del bloqueador (91.5 ± 16.9 , $n=10$), pero similar a la secreción basal que se produce al estimular con 1 Hz ó con 10 Hz o alto K^+ en presencia de Mg^{2+} (ver sección anterior). Cuando 9 de éstas neuronas fueron incubadas con cafeína, para producir la liberación de calcio de los depósitos intracelulares (Rousseau y Meissner, 1989; Sitsapesan y Williams, 1990; Armstrong et al., 1991), en presencia de FM1-43 y nimodipina, el número de puntos fluorescentes se incrementó a 73.2 ± 12.5 , alcanzando niveles similares a los de las células estimuladas en ausencia de nimodipina (Fig. 12B, C), de modo que las células aún eran capaces de secretar ante una elevación de

concentración interna de calcio.

Estudios previos en neuronas de Retzius (Dierkes et al., 1997; Beck et al., 2001) mostraron que la entrada de calcio al soma es dependiente de canales tipo L, pero no es afectada por la ω -Conotoxina GVIA, que bloquea canales de tipo N, ni por la ω -Agatoxina IVA o la ω -Agatoxina TK, que bloquean canales de tipo P/Q. Esta falta de efecto puede deberse a la insensibilidad de las neuronas de esta especie a toxinas bloqueadoras de canales iónicos (Johansen y Kleinhaus, 1986). Sin embargo, la posible participación de otros tipos de canales de calcio en la secreción somática, fue evaluada estimulando neuronas de Retzius con 40 mM de K^+ en presencia de FM1-43 y de otro grupo de toxinas bloqueadoras de los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} . Probamos ω -Conotoxina MVIIA (2 μ M; n=6), que bloquea canales de calcio de tipo N; FTX 3.3 (1 μ M; n=8), que bloquea canales de tipo P/Q; ω - Conotoxina MVIIC (1 μ M; n=6), que bloquea canales tipo Q, y PLTX-II (50 nM; n=8), que bloquea canales de calcio de insectos. La estimulación en estos experimentos se llevó a cabo despolarizando las neuronas por 5 minutos con alto K^+ . Como se muestra en la tabla 1, únicamente la nimodipina (20 μ M; n=7) redujo la tinción somática de manera significativa en un 47% con respecto al control.

Figura 12. Bloqueo de la secreción somática por nimodipina.

A, imagen de fluorescencia de una neurona de Retzius estimulada con un tren a 20 Hz en presencia de nimodipina 10 μ M y de FM1-43. Se observan muy pocos puntos (flechas). Barra de escala=20 μ m. B, la incubación subsecuente con cafeína 10 mM en presencia de FM1-43 incrementó el número de puntos fluorescentes. El plano focal es el mismo que en A. Nótese que los puntos en A también están presentes en B. C, número de puntos producidos por las condiciones de estimulación en A y B, comparados con neuronas control estimuladas con un tren a 20 Hz. Tomado de Trueta et al., 2003.



Tipo de Canal	Toxina	Concentración	No. de Puntos/ Soma	n
L	Nimodipina	20 μ M	88.42 \pm 7.86 *	7
P/Q	FTX 3.3	1 μ M	176.50 \pm 11.83	8
Q	ω -Cono-MVIIC	1 μ M	175.00 \pm 22.94	6
N	ω -Cono-MVIIA	2 μ M	183.33 \pm 7.74	6
Insectos	PLTX	50 nM	179.62 \pm 12.09	8
Control (K ⁺ con Ca ²⁺)			166.87 \pm 16.80	8
Control negativo (K ⁺ con Mg ²⁺)			41.66 \pm 9.90	6

Tabla 1. Efectos de diferentes bloqueadores de canales de calcio en la secreción somática. La secreción fue estimulada con 40 mM de K⁺ por 5 minutos. El número de puntos por soma se expresa como la media \pm el error estándar. El asterisco indica una diferencia significativa con respecto al control.

Participación de las pozas intracelulares de calcio en la secreción somática

La dependencia de la frecuencia de disparo en la secreción somática sugiere que la acumulación del calcio que entra con impulsos subsecuentes es necesaria para producir la secreción somática. Además, la cooperatividad de la secreción en función de la frecuencia sugiere que se requieren varios factores para su activación. Considerando que las neuronas de Retzius tienen una baja densidad de canales de calcio en el soma (Fernández de Miguel et al., 1992), supusimos que la liberación de calcio de los depósitos intracelulares (Pozzan et al., 1994) podría reforzar la entrada de calcio transmembranal y proveer una elevación de la [Ca²⁺], suficiente para producir la secreción, de nuevo como ocurre en células endocrinas (Lemmens et al., 2001; Kang y Holz, 2003). Esto fue apoyado por la observación anterior de que la incubación con cafeína recupera el nivel de secreción después del bloqueo de los canales tipo L.

Como primer paso para probar la posible contribución de la liberación intracelular de calcio en la secreción somática, analizamos el patrón de tinción de FM1-43 producido por cafeína, la cual se une a los receptores de rianodina e incrementa su probabilidad de apertura (Usachev and Thayer, 1997; Sitsapesan y Williams, 1990). La incubación con cafeína (10 mM) por 5 minutos en presencia de FM1-43, produjo un patrón de tinción fluorescente muy similar al producido con alto K⁺ o con trenes de impulsos a altas frecuencias. La figura 13 muestra la

superposición de imágenes confocales de neuronas de Retzius estimuladas con cafeína (Fig. 13A) y con alto K^+ (Fig. 13B), así como la cuantificación de los puntos fluorescentes producidos en ambas condiciones y con estimulación a 10 Hz (Fig. 13C). La incubación con cafeína produjo 168 ± 21.7 puntos por soma ($n=10$), cantidad estadísticamente similar a la producida por la despolarización con alto K^+ (166.87 ± 16.8).

El efecto de la cafeína se previno en un 50% mediante la incubación previa con tapsigargina

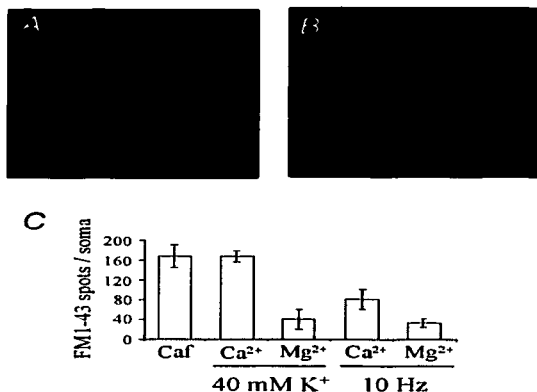


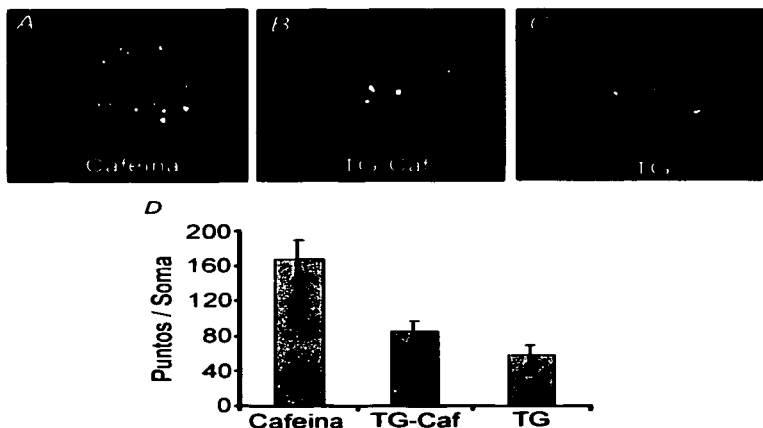
Figura 13. Estimulación de la secreción somática por la liberación de calcio intracelular. A, reconstrucción tridimensional confocal de una neurona incubada con cafeína 10 mM en presencia de FM1-43, y en ausencia de estimulación eléctrica y de Ca^{2+} extracelular. Escala = $30 \mu m$ (también para B). B, la reconstrucción de otra neurona despolarizada con 40 mM de K^+ se muestra para comparación. C, el número de puntos por soma en neuronas estimuladas con cafeína fue similar al de neuronas despolarizadas con alto K^+ y mayor al de las estimuladas con trenes de 10 impulsos a 10 Hz en presencia de Ca^{2+} extracelular.

(200 nM) durante 30 minutos para provocar el vaciamiento de las pozas intracelulares de calcio (Fig. 14; comparar A y B; $n=9$). Para descartar que esta reducción fuera debida al agotamiento de las pozas de vesículas en respuesta a la fuga de calcio producida por la tapsigargina, cuantificamos la tinción producida por la incubación con tapsigargina en presencia de FM1-43, en un medio sin Ca^{2+} extracelular. La tapsigargina por sí misma produjo 58.77 ± 10.8 puntos por soma, cantidad similar a la basal (Fig. 14), descartando que la fuga de calcio producida por la tapsigargina produzca secreción somática.

Para valorar el posible papel fisiológico de la liberación de calcio intracelular, estimulamos neuronas con trenes de 10 impulsos a 10 Hz en presencia de rianodina $100 \mu M$, que en esta concentración, mantiene cerrados a los receptores liberadores de calcio (McPherson et al., 1991)

y por lo tanto bloquea la liberación de calcio inducida por calcio (Lattanzio et al., 1987; Meissner, 1986). Con esto la secreción somática disminuyó significativamente, en un 42% con respecto a las neuronas control (de 146.7 ± 18.24 puntos en los controles; $n=11$ a 85.45 ± 14.21 puntos en presencia de rianodina; $n=11$; Fig. 15A). La re-estimulación de estas neuronas con un tren a 10 Hz después de incrementar la concentración de calcio extracelular a 10 mM, incrementó significativamente el número de puntos por soma a 132.12 ± 18.76 (Fig. 15B).

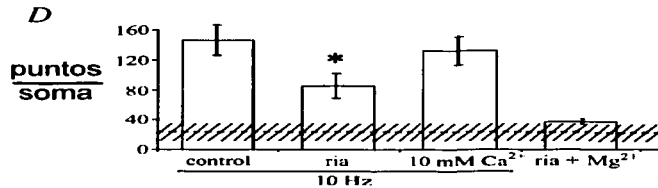
Figura 14. Disminución de la tinción estimulada con cafeína por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio. A, neurona de Retzius incubada con cafeína por 5 minutos en presencia de FM1-43. B, el pretratamiento por 30 minutos con tapsigargina (TG) para vaciar los depósitos intracelulares de calcio redujo el número de puntos producidos por la incubación con cafeína en presencia de FM1-43. C, la incubación con tapsigargina en presencia de FM1-43 no produjo una tinción por sí misma. Escala para A-C = 30 μ m. D, cuantificación del número de puntos por soma producidos por los tratamientos mostrados en A-C.



La rianodina, en ciertas concentraciones mantiene a su receptor en un estado de subconductancia (Fill y Coronado, 1988) que permite una fuga continua de calcio (Meissner, 1986). En este caso, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ podría evocar secreción y disminuir la poza de vesículas secretoras en la neurona durante la incubación, explicando alternativamente la reducción de la secreción. Para descartar este posible efecto, incubamos neuronas de Retzius con rianodina en presencia de FM1-43 en una solución sin Ca^{2+} y con Mg^{2+} . El número de puntos por soma en estas neuronas fue 43.66 ± 4.27 ($n=6$; Fig. 15C), similar a la tinción basal. Por lo tanto, podemos atribuir la disminución de la tinción somática en las neuronas estimuladas en presencia de rianodina al bloqueo de la liberación de calcio inducida por calcio.



Figura 15.
Dependencia de la liberación de calcio inducida por calcio para la secreción somática. A, imagen de fluorescencia de una neurona de Retzius estimulada con un tren a 10 Hz en presencia de rianodina 100 μ M. En estas condiciones se observó un número de puntos menor que en las neuronas control. Escala= 20 μ m. B, la re-estimulación de la misma neurona a 10



Hz en presencia de 10 mM de Ca²⁺ extracelular incrementó el número de puntos fluorescentes. Las flechas indican nuevos puntos. El asterisco muestra un punto de referencia para comparación. C, la incubación con rianodina en presencia de FM1-43 no produjo una tinción significativa. D, cuantificación del número total de puntos por soma en 6 neuronas con cada uno de los tratamientos en A-C, comparado con el número de puntos en neuronas control estimuladas a 10 Hz. La franja de diagonales indica la tinción basal obtenida en células estimuladas a 10 Hz con Mg²⁺ substituyendo el Ca²⁺.

El conjunto de resultados presentados en esta primera parte muestran que ante trenes de impulsos a frecuencias superiores a 2 Hz, la entrada de calcio principalmente a través de canales tipo L es reforzada por la liberación de calcio de pozas intracelulares y con ello se induce la secreción somática a partir de la fusión de vesículas de núcleo denso. La siguiente pregunta abordada en este trabajo es cuáles son las semejanzas y las diferencias entre la secreción somática y la sináptica, dado que ambas coexisten en la misma neurona.

II. Liberación sináptica de serotonina en las neuronas de Retzius

El mecanismo de secreción somática mostrado en la sección anterior contrasta con el de la secreción sináptica, en la que un impulso basta para producir liberación (Fuchs et al., 1982; Henderson et al., 1983). Esto sugiere que las neuronas de Retzius se comportan de modo distinto en el soma y en las sinapsis. Sin embargo, se desconoce cómo responde la sinapsis a trenes de impulsos con las frecuencias a las que se produce la secreción somática, y si los mecanismos que regulan ésta también se presentan en la sinapsis o son distintos. En esta sección presento un estudio de la dependencia de la frecuencia y la regulación de la secreción sináptica, mostrando similitudes y diferencias con la secreción somática.

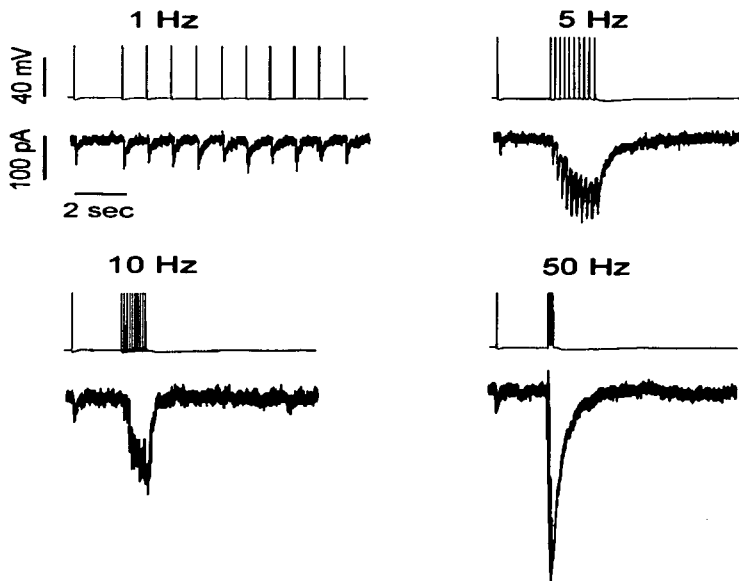


Figura 16. Dependencia de la frecuencia para la transmisión sináptica en condiciones fisiológicas. Respuestas Pre- y postsinápticas a la estimulación intracelular de la neurona presináptica con un impulso sencillo seguido de un tren de 10 impulsos a 1, 5, 10 ó 50 Hz en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. Los experimentos fueron realizados disminuyendo la concentración extracelular de Cl^- de 128 a 68 mM para incrementar la amplitud de las corrientes postsinápticas.

Analizamos la secreción sináptica a partir de las corrientes postsinápticas, medidas en condiciones de fijación de voltaje con un microelectrodo. La neurona presináptica se estimuló con un impulso sencillo seguido por un tren de 10 impulsos a distintas frecuencias y el potencial de membrana de la célula postsináptica se fijó a -50 mV para registrar las corrientes postsinápticas (Fig. 16). Ante un tren de 1 Hz las corrientes postsinápticas en respuesta a cada impulso fueron similares. Sin embargo, a 2 Hz ó más, la amplitud de las respuestas a impulsos subsecuentes varió a lo largo del tren. Por ejemplo, a 5 Hz las corrientes se incrementaron al inicio del tren, mostrando facilitación, pero al final se redujeron, mostrando depresión. Estas variaciones fueron características de cada frecuencia. Las amplitudes de las corrientes postsinápticas en respuesta a cada impulso presináptico son una medida de la liberación presináptica a lo largo del tren. Sin embargo, a partir de 10 Hz el análisis de las respuestas individuales se dificultó debido al curso temporal de las corrientes sinápticas, que hace que la respuesta a cada impulso se sobreponga con la siguiente. Para tener un índice global de la respuesta sináptica en función de la frecuencia, normalizamos las respuestas totales al tren con la respuesta unitaria. Para ello, la corriente evocada por el tren de diez impulsos se integró y la carga se dividió entre la producida por el pulso de prueba multiplicada por diez. De este modo, los valores superiores a 1 mostrarían una predominancia de la facilitación durante el tren, mientras que los valores inferiores a 1 indicarían depresión predominante. El cálculo se hizo de acuerdo con la fórmula: $I = \frac{\int T}{10 \int u}$

Donde I es el índice de liberación sináptica a lo largo del tren con respecto a la respuesta unitaria, $\int T$ es la integral de las corrientes producidas en respuesta al tren completo, y $\int u$ es la integral de la corriente en respuesta al impulso sencillo antecediendo al tren. Este procedimiento no aporta información acerca de la dinámica instantánea a lo largo del tren, sino sólo un estimado promedio de las respuestas a los diez impulsos, pero permite comparar la función de la frecuencia de la secreción sináptica con la somática.

El índice de liberación sináptica (Fig. 17) fue cercano a 1 (1.02 ± 0.07) para trenes a 1 Hz, y se incrementó con la frecuencia del tren de impulsos impuesto a la neurona presináptica. El índice de liberación tuvo dos fases: entre 1 y 5 Hz, se incrementó rápidamente, alcanzando un valor de 3.15 ± 0.47 a 5 Hz; sin embargo, a 10 Hz la eficiencia sináptica disminuyó consistentemente, a una media de 2.45 ± 0.24 (nótesis también la reducción en el error estándar), y a frecuencias mayores se incrementó nuevamente, tendiendo a la saturación, aunque ésta no se alcanzó a 50 Hz, que fue la máxima frecuencia de estimulación que analizamos. A pesar de que el incremento

en la frecuencia favoreció un incremento en la magnitud de la respuesta postsináptica, este comportamiento es a primera vista distinto del somático, que tuvo umbral más alto y fue una función sigmoidal de la frecuencia.

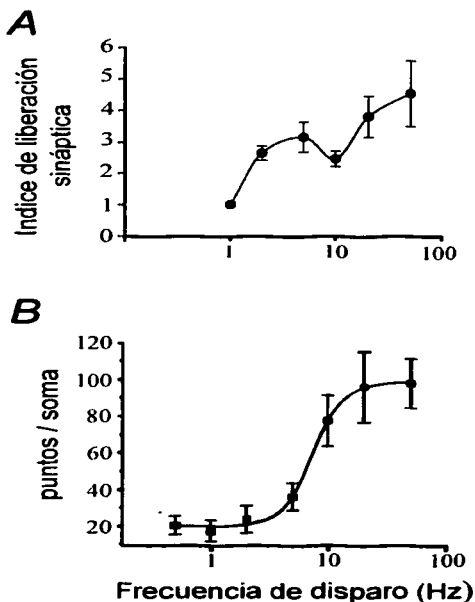


Figura 17. Relación de la eficiencia de la transmisión sináptica con la frecuencia de disparo en condiciones fisiológicas. A, el índice de liberación se calculó como la integral de la corriente sináptica en respuesta al tren de 10 impulsos dividida entre 10 X la integral de la corriente sináptica unitaria. Los valores por encima de la línea punteada representan facilitación sináptica y los valores por debajo representan depresión sináptica. Los puntos son los datos experimentales \pm el error estándar, y la línea continua es un ajuste de la función mostrada en el recuadro, con los parámetros que se indican. B, se muestra la curva de secreción somática en función de la frecuencia de disparo, para comparación.

La forma de la curva descrita sugiere varios componentes en la liberación: a bajas frecuencias se induce posiblemente liberación del contenido de vesículas claras, que se facilita al aumentar la frecuencia, ya que al entrar más calcio y acumularse dentro de la terminal, la cantidad de cuantos liberados se hace mayor (Katz y Miledi, 1967) dando lugar a una liberación que guarda una relación no-lineal con la concentración de calcio en la terminal (Dodge y Rahamimoff, 1967; Smith et al., 1985). Sin embargo, es de esperarse que gradualmente la facilitación se reduzca y se haga aparente la depresión al sobrepasarse la capacidad de recuperación de la poza liberable (Schneppenburger et al., 1999; Meyer et al., 2001). Esto

podiera explicar la reducción del índice de liberación a 10 Hz, explicando también la reducción de la dispersión de los datos. Adicionalmente, a partir de cierta frecuencia se reclutaría la liberación a partir de vesículas electrodensas, que teóricamente tendrían una función sigmoideal, reflejando un comportamiento similar al somático. Esto explicaría la fase de incremento en la liberación a partir de 20 Hz, con tendencia a la saturación.

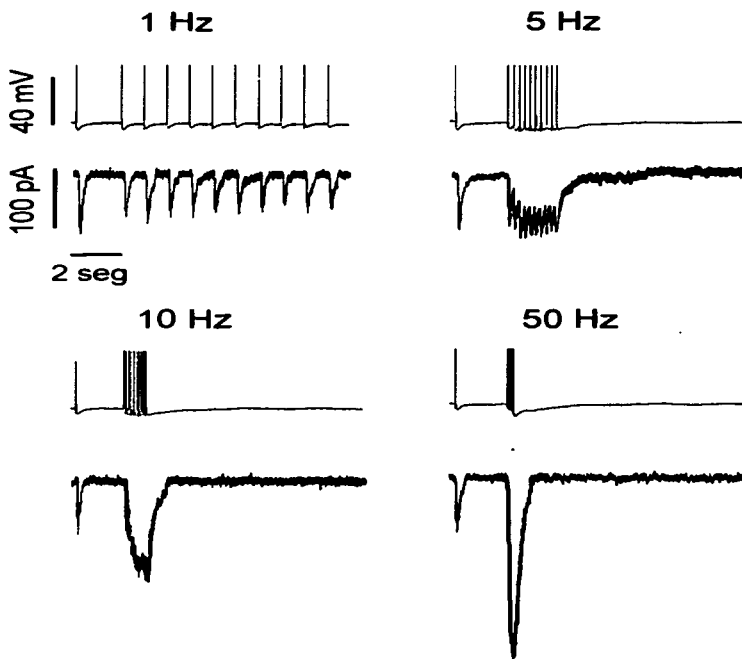


Figura 18. Dependencia de la frecuencia para la transmisión sináptica en condiciones de alta probabilidad de liberación. Respuestas pre- y postsinápticas a la estimulación intracelular de la neurona presináptica con un impulso sencillo seguido de un tren de 10 impulsos a 1, 5, 10 ó 50 Hz en presencia de 10 mM de Ca^{2+} extracelular.

El reclutamiento de vesículas electrodensas a frecuencias altas es apoyado por registros amperométricos en las neuronas de Retzius (Bruns y Jahn, 1995), que muestran que impulsos únicos producen liberación a partir de vesículas claras y a lo largo de trenes de tres impulsos se incrementa la probabilidad de exocitosis a partir de vesículas de núcleo denso. Como una

primera aproximación para probar esta hipótesis, incrementamos la probabilidad de liberación aumentando la concentración extracelular de calcio a 10 mM. Con ello esperaríamos incrementar la cantidad de transmisor liberado por los primeros impulsos del tren y con ello favorecer el agotamiento gradual de la poza liberable de vesículas claras y por lo tanto la depresión (Meyer et al., 2001) y a la vez favorecer la liberación a partir de vesículas electrodensas. La figura 18 muestra registros representativos de las respuestas pre y postsinápticas en estas condiciones. Las corrientes sinápticas en respuesta a un solo impulso fueron mayores que con baja probabilidad de liberación y fueron obvias aún sin reducir la concentración externa de cloro. Por esta diferencia en las condiciones experimentales no es posible comparar directamente las amplitudes de las corrientes. La estimulación con trenes de 10 impulsos a frecuencias de 0.5 a 2 Hz produjo depresión gradual de las corrientes sinápticas a lo largo del tren (Fig. 19), explicable con base en el agotamiento de la poza de vesículas claras en la terminal presináptica dada la alta probabilidad de liberación, como ocurre en la sinapsis del cáliz de Held (Meyer et al., 2001). Al incrementar la frecuencia a 5 Hz el índice de liberación fue cercano a 1, y aumentó con frecuencias mayores, mostrando facilitación, lo que sugiere el reclutamiento de otra poza de vesículas, posiblemente las de núcleo denso. La facilitación disminuyó de nuevo al incrementar la frecuencia a 50 Hz (Fig. 19), sugiriendo que esta segunda poza se deprime a frecuencias cercanas a 50 Hz.

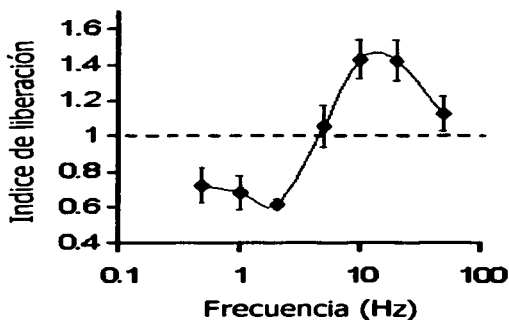


Figura 19. Relación de la eficiencia de la transmisión sináptica con la frecuencia de disparo en condiciones de alta probabilidad de liberación.

El índice de liberación se calculó como en la figura 17. Los valores por encima de la línea punteada representan facilitación sináptica y los valores por debajo representan depresión sináptica. Nótese la diferencia de escala en el eje de las ordenadas con la figura 17.

Los cambios descritos no tuvieron un origen postsináptico, ya que la respuesta de las células P a la aplicación de trenes iontoforéticos de serotonina a 10 Hz se mantuvo lineal durante 3 segundos (Fig. 20), descartando que la disminución en la respuesta se deba a la desensibilización de los receptores postsinápticos a serotonina.

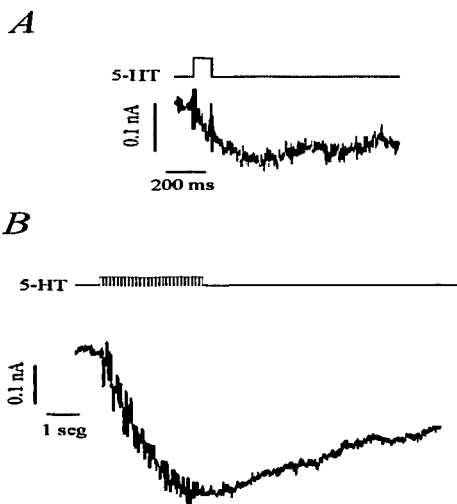


Figura 20. Ausencia de desensibilización de los receptores a 5-HT en las células P. Corrientes transmembranales producidas por la aplicación de pulsos iontoforéticos de 5-HT a través de un microelectrodo colocado cerca de una célula P postsináptica. Registros en fijación de voltaje con un microelectrodo lleno de 1M de CsCl. A, Respuesta a un pulso de 100 ms. B, Respuesta a un tren de pulsos de 100 ms a 10 Hz durante 3 seg.

Participación de los canales de calcio tipo L en la liberación sináptica

Las vesículas de núcleo denso liberan por lo general su contenido en sitios perisinápticos (Golding y Bayraktaroglu, 1984). Dado que la secreción somática a partir de vesículas de núcleo denso es mediada por canales tipo L, es posible que el mismo tipo de canal de calcio pudiera estar mediando la fusión de vesículas densas cerca de las terminales. Si este fuera el caso, el bloqueo de los canales tipo L podría eliminar el componente de facilitación en condiciones de alta probabilidad de liberación, con alteraciones menores en las respuestas de baja frecuencia. Para probar esto, registramos las respuestas postsinápticas en condiciones de alta probabilidad de liberación y en presencia de nimodipina (10 μ M) en el medio extracelular. A frecuencias bajas,

en todas las sinapsis probadas se mantuvo una depresión gradual a lo largo del tren. Además, en 8 de 13 sinapsis estudiadas, a frecuencias altas no hubo facilitación y predominó la depresión sináptica (Fig. 21). La figura 22 muestra el índice de liberación calculado a partir de las integrales de las corrientes en estas 8 sinapsis, en comparación con las sinapsis control con 10 mM de Ca^{2+} extracelular en ausencia de nimodipina. Únicamente a 2 Hz hubo menos depresión en presencia de nimodipina que en los controles (asterisco en Fig. 22), sugiriendo que los canales de tipo L pudieran participar en la movilización de las vesículas de reserva a partir de ésta frecuencia, con lo que se incrementa la liberación ante los primeros impulsos, agotándose antes la poza de vesículas.

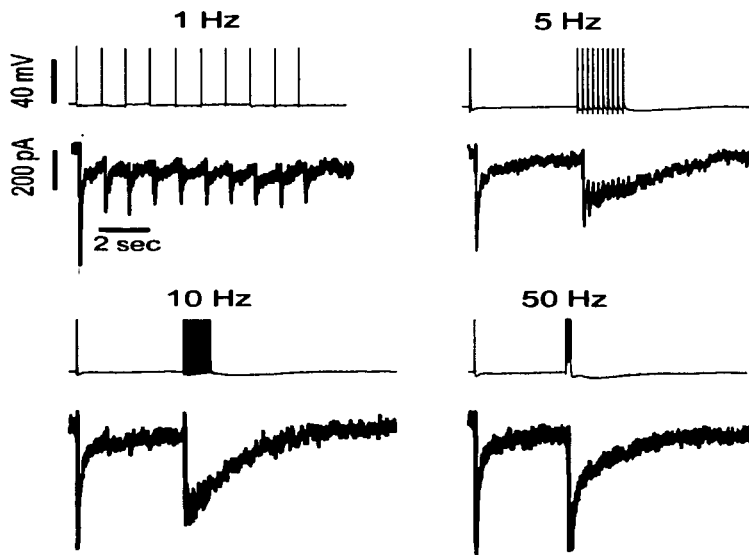


Figura 21. Efecto del bloqueo de los canales de calcio de tipo L en la transmisión sináptica con alta probabilidad de liberación. Respuestas pre- y postsinápticas a la estimulación intracelular de la neurona presináptica con un impulso sencillo seguido de un tren de 10 impulsos a 1, 5, 10 ó 50 Hz en presencia de 10 mM de Ca^{2+} extracelular y nimodipina 10 μM .

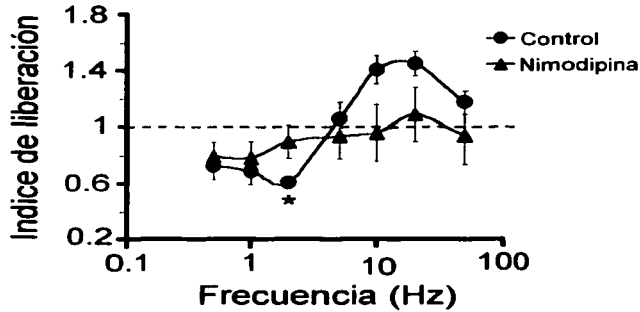


Figura 22. Cuantificación de los efectos del bloqueo los canales de calcio de tipo L en la transmisión sináptica con alta probabilidad de liberación. El índice de liberación se calculó como en la figura 17. La adición de nimodipina eliminó la facilitación sináptica y produjo depresión a todas las frecuencias.

En otros 5 pares de células tratadas con nimodipina, no hubo ninguna diferencia con respecto a los controles. Esto pudiera deberse a una disolución incompleta de la nimodipina en el medio de registro, a la inactivación del fármaco durante el experimento, o a una falta de respuesta de las células al bloqueador. Dado que en los experimentos en ausencia de nimodipina nunca hubo esta variabilidad ni se encontraron dos poblaciones de resultados, suponemos que estas neuronas no respondieron debido a variaciones en las condiciones experimentales y no a una variabilidad intrínseca entre ellas.

Papel de la liberación de calcio inducida por calcio en la liberación sináptica de serotonina

Una conclusión del trabajo en el soma, es que los canales de calcio y los receptores de rianodina forman complejos funcionales para cooperar en la secreción. El acoplamiento entre los receptores de rianodina y los canales de calcio se ha demostrado en células endocrinas (Tse y Tse, 1999) y neuronas (Chavis et al., 1996), y en fibras musculares estos dos tipos de canales forman incluso un complejo molecular (Agnew, 1988; Block et al., 1988; Chadwick et al., 1988). Esto abre la posibilidad de un acoplamiento funcional entre los canales de tipo L, los receptores de rianodina y las vesículas de núcleo denso, operando como un subcompartimento dentro de la sinapsis. En las terminales sinápticas de las neuronas de Retzius hay retículo endoplásmico muy cerca de las terminales sinápticas. La figura 23A es una micrografía electrónica de una terminal

en una sinapsis Retzius-P en cultivo, proporcionada por el Dr. Juan Fernández de la Universidad de Chile, mostrando organelos intracelulares similares al retículo endoplásmico de otros tipos neuronales (Peters et al., 1991). Esta evidencia sugiere que los depósitos intracelulares de calcio podrían ser parte del mecanismo de la liberación de serotonina en la sinapsis.

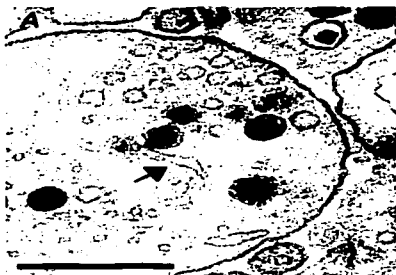
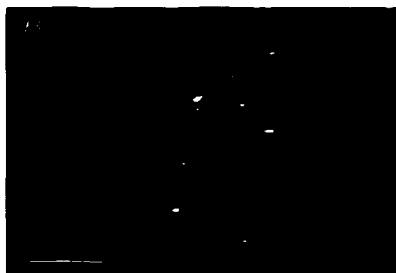


Figura 23. Co-localización de sitios de liberación de neurotransmisor con los depósitos intracelulares de Ca^{2+} en las neuronas de Retzius. A, micrografía electrónica de un botón sináptico con retículo endoplásmico liso (marcado con la flecha) cerca de las vesículas. Escala = 400 nm. Proporcionada por el Dr. Juan



Co-localización de los receptores de rianodina con los sitios de secreción

Como una primera aproximación, analizamos si los depósitos intracelulares de calcio co-localizan con los sitios de liberación presinápticos. Para ello hicimos dobles tinciones usando FM1-43 para marcar las vesículas sinápticas y un derivado fluorescente de la rianodina (bodypi-TR-rianodina) para marcar los receptores liberadores de calcio de los depósitos intracelulares. La co-localización se buscó en los muñones de las neuronas vivas mediante microscopía confocal.

Los receptores a rianodina estaban ampliamente distribuidos en las neuronas, formando redes tanto en el soma como en el muñón y los conos de crecimiento. El FM1-43, en cambio, tuvo un patrón puntiforme, similar al ya descrito en el soma, aunque como ya se mencionó, la microscopía electrónica mostrada en la figuras 2 y 23A así como los registros amperométricos de Bruns y Jahn (1995), han mostrado que en esta región los sitios de liberación son zonas activas que incluyen tanto vesículas claras como de núcleo denso (Kuffler et al., 1987; Bruns et al., 2000). La imagen confocal de la figura 23B fue tomada de una zona del muñón. La rianodina fluorescente se ve en rojo y el FM1-43 en verde. En los puntos amarillos co-localizan ambos marcadores, sugiriendo que los sitios de liberación de calcio intracelular están suficientemente cerca de los sitios de secreción para poder participar en la liberación de serotonina.

Papel de la liberación de calcio inducida por calcio en la liberación sináptica de serotonina.

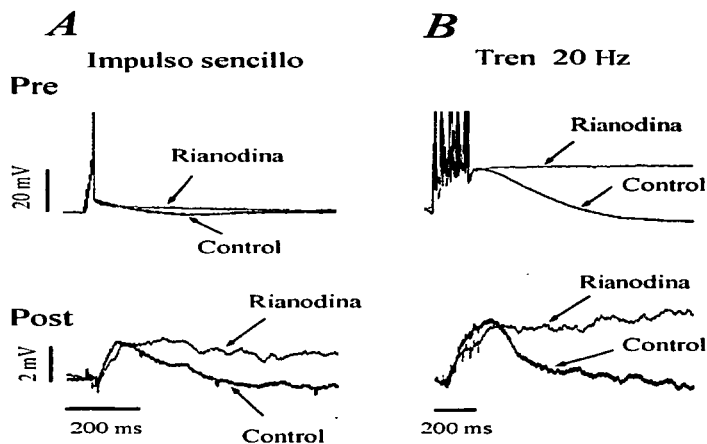
El papel de la liberación de calcio intracelular en la secreción sináptica de serotonina fue estudiado mediante registros intracelulares convencionales en sinapsis Retzius-P en cultivo. Usamos rianodina (100 μM), para inhibir la liberación de calcio inducida por calcio (Meissner, 1986; Lattanzio et al., 1987; McPherson et al., 1991). Antes de aplicar la rianodina, un pulso de corriente despolarizante de 30 ms en la neurona presináptica produjo un potencial de acción seguido de una hiperpolarización postpotencial (Fig. 24A, panel superior, trazo negro). El potencial postsináptico en estas condiciones tuvo un tiempo medio de caída de 70.5 ± 28.92 ms ($n=11$; Fig. 24A, panel inferior, trazo negro). La aplicación de rianodina 100 μM a las mismas células abolió la hiperpolarización postpotencial (Fig. 24A, panel superior, trazo gris), y produjo un alargamiento del potencial postsináptico (Fig. 24A, panel inferior, trazo gris). Al aplicar pulsos pareados o de mayor duración (200 ms) para producir trenes de impulsos en la neurona presináptica, la rianodina produjo una despolarización postpotencial de hasta 20 mV, que duró varios segundos, acompañada de nuevo por un alargamiento del potencial sináptico (Fig. 24B). Como control, registramos las respuestas postsinápticas en ausencia de rianodina a lo largo del tiempo. En estos casos, el tiempo medio de caída del potencial sináptico se incrementó sólo marginalmente a lo largo de 5 minutos de registro (Fig. 25, triángulos negros).

Los cambios producidos por la rianodina, fueron significativos (círculos grises en Fig. 25). Ante un impulso sencillo, la rianodina incrementó el tiempo de caída de 70.5 ± 28.92 ms al inicio

Figura 24. La liberación de calcio inducida por calcio activa una hiperpolarización postpotencial que detiene la liberación de serotonina.

A, potencial de acción presináptico en la neurona de Retzius y potencial postsináptico registrado en la célula P, en respuesta a un pulso de corriente despolarizante en la célula de Retzius en condiciones control (negro) y después

de 5 minutos con rianodina 100 μ M (gris), B, Respuestas pre y postsinápticas a una despolarización presináptica de 200 ms para producir un tren de impulsos en la célula de Retzius. El bloqueo de la liberación de calcio inducida por calcio por rianodina eliminó la hiperpolarización postpotencial lenta en la neurona de Retzius y prolongó el potencial postsináptico en la célula P.



del registro a 389.73 ± 100.35 ms después de 5 minutos ($n=3$), es decir, produjo un incremento del 552 ± 174 %, mientras que en condiciones control sólo cambió de 106.13 ± 21.57 ms a 131.21 ± 25.23 ms en 5 minutos de registro ($n=11$). Con impulsos pareados, el potencial sináptico en presencia de rianodina se incrementó en un 436 ± 168 %, de 140.82 ± 19.34 ms a 689.22 ± 271.28 ms ($n=5$), mientras que en los controles sólo cambió de 168 ± 34.58 ms a 188.53 ± 28.09 ms ($n=13$). Con trenes de 5 ó 6 impulsos a 20 Hz la rianodina incrementó el tiempo de caída del potencial sináptico en un 420 ± 105 %, de 335.88 ± 116.69 ms a 1454.28 ± 325.84 ms ($n=5$), mientras que en condiciones control el cambio fue de 392.66 ± 108 ms a 441.96 ± 100.11 ms ($n=8$). Los cambios en la respuesta postsináptica no se debieron a cambios en la resistencia de entrada o la constante de tiempo de la membrana postsináptica (Fig. 26A). La respuesta de la neurona postsináptica a la serotonina aplicada por iontoforesis (ver Fig. 4 en sección de métodos) tampoco fue alterada por la rianodina (Fig. 26B), lo que sugiere que los

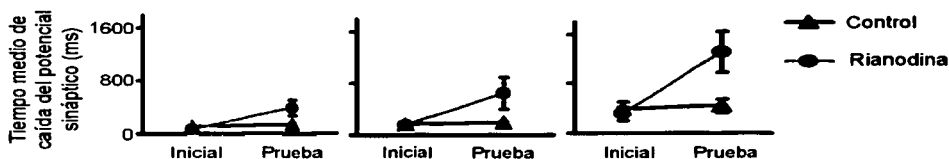
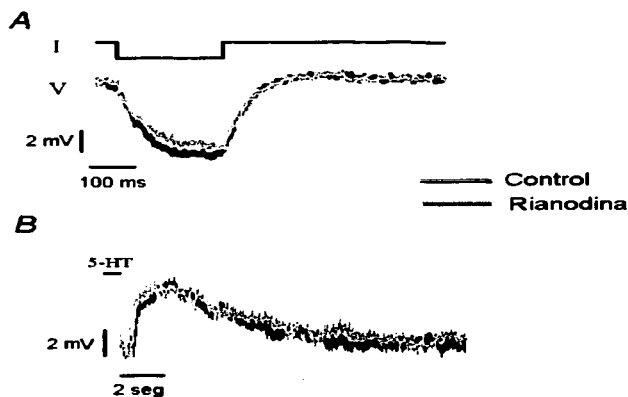


Figura 25. Alargamiento del potencial sináptico por el bloqueo de la liberación de calcio intracelular. Tiempo medio de caída del potencial postsináptico antes (inicial) y 5 minutos después (prueba) de la adición de rianodina 100 μ M. Las células control fueron registradas en ausencia de rianodina. Los resultados se presentan como la media \pm el error estandar de al menos 6 pares para cada grupo.

efectos sobre el alargamiento del potencial sináptico se deben a cambios presinápticos en la liberación del neurotransmisor. Los resultados de esta segunda parte muestran que la liberación sináptica de serotonina en condiciones fisiológicas se activa de manera estable a frecuencias menores a 2 Hz y se facilita a frecuencias mayores. Los canales de tipo L y la liberación de calcio intracelular participan en la liberación de serotonina sináptica. La figura 27 es un esquema de los posibles mecanismos de regulación de la liberación sináptica planteados a partir de estos resultados.

Figura 26. La rianodina no afecta las propiedades de la membrana de la célula postsináptica. Respuesta en voltaje de la célula P a un pulso de corriente hiperpolarizante (A) y a un pulso iontoforético de serotonina (mostrado por la barra negra) (B), antes (trazos negros) y 10 minutos después de la adición de rianodina 100 μ M (trazos grises). La rianodina no cambió la resistencia de entrada o la constante de tiempo de la membrana, ni el curso temporal de la respuesta a 5-HT.



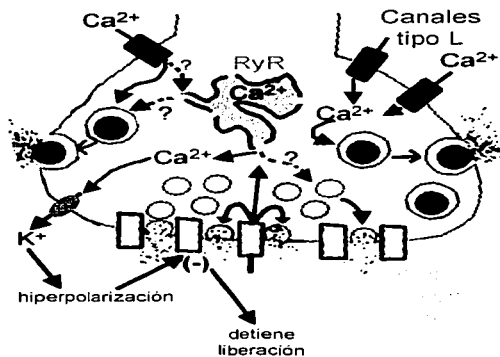


Figura 27. Esquema de los posibles mecanismos de regulación de la secreción sináptica de serotonina. Con la llegada de un impulso, se abren canales de calcio en la membrana presináptica y se produce la fusión de vesículas claras. El calcio transmembranal activa receptores de rianodina (RyR) en el retículo endoplásmico y produce la liberación de calcio intracelular. Este activa canales de potasio dependientes de calcio y produce la hiperpolarización de la membrana, con lo cual se cierran los canales de calcio y se detiene la liberación. El calcio intracelular podría también producir la fusión vesicular o la movilización de vesículas de la poza de reserva a la poza liberable. A altas frecuencias, se activan también canales de calcio tipo L (rectángulos rosas) en sitios perisinápticos, que producen la exocitosis de vesículas electrodensas. Los rectángulos azules representan otros tipos de canales de calcio, todavía no identificados.

III. Regulación de la frecuencia de disparo de las neuronas de Retzius por neuronas mecanosensoriales

Para proveer información acerca de las posibles vías de estimulación de la secreción somática, analizamos cualitativamente el papel de la estimulación mecanosensorial sobre la actividad eléctrica de las neuronas de Retzius. Las neuronas de Retzius responden a estímulos táctiles a la piel (Wilson et al., 1996b) y reciben una entrada polisináptica proveniente de las células P (Wittenberg et al., 1990; Szczupak and Kristan, 1995), así como de quimiorreceptores y termorreceptores (Zhang et al., 2000). Además de las células P, hay otros dos tipos de neuronas mecanosensoriales en el ganglio. En cada ganglio tres neuronas responden al tacto (células T) y dos responden a estímulos nociceptivos (células N) aplicados a la piel ipsilateral y otras tantas a la piel contralateral (Nicholls y Baylor, 1968; Blackshaw et al., 1988).

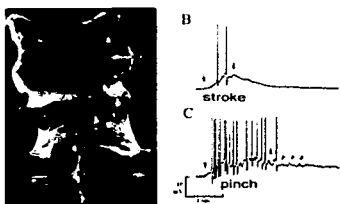


Figura 28. Respuestas de las neuronas de Retzius a la estimulación mecanosensorial de la piel. A, preparación de un segmento de la pared corporal unido al ganglio. La flecha blanca apunta hacia la parte anterior. Las neuronas de Retzius son los óvalos blancos en la parte anterior del ganglio. B, respuesta intracelular al roce de la piel. El inicio del estímulo (flecha hacia abajo), indicado por los artefactos, fue seguido de potenciales sinápticos excitadores y potenciales de acción. Después del término del estímulo (flecha hacia arriba), la neurona de Retzius se repolarizó gradualmente. C, respuesta con alta frecuencia de la neurona de Retzius a un pellizco en la piel. Las flechas grises indican el tiempo aproximado de inicio y final del pellizco. La serie de EPSPs después del estímulo (cabezas de flecha) indican entradas sinápticas excitadoras a la neurona de Retzius que continuaron activas. Tomado de Velazquez-Ulloa et al., 2003.

La figura 28A muestra un ganglio unido a un segmento de piel por las raíces laterales. La estimulación mecánica, ya sea por roce o pinzamiento aplicados a la parte central de la piel, produjo respuestas sinápticas y potenciales de acción en las neuronas de Retzius (Fig. 28B y C). Las flechas indican los tiempos del inicio y término del estímulo mecánico, que en algunos casos pudieron determinarse por los artefactos en el registro. El contacto o roce con la piel produjeron predominantemente potenciales sinápticos, siempre excitadores (EPSPs), ya que su polaridad no cambió al registrar con electrodos llenos de cloruro de potasio o de acetato de potasio, ni se invirtieron al cambiar el potencial de reposo de las neuronas de Retzius en un intervalo

entre -80 y -40 mV por inyección de corriente directa en sus somas. Al pellizcar la piel con las pinzas, las células de Retzius se despolarizaron gradualmente y generaron potenciales de acción. Estas respuestas se mantuvieron durante el estímulo ($n=13$), y al término de éste persistieron series de EPSPs (cabezas de flecha). Ante esta forma de estimulación, las neuronas de Retzius produjeron frecuencias de disparo promedio hasta de 50 Hz, que son suficientes para inducir secreción somática de serotonina.

Respuestas simultáneas de las dos neuronas de Retzius del ganglio

Ambas células de Retzius en cada ganglio respondieron simultánea y sincrónicamente a la estimulación unilateral de la piel (Fig. 29). Esto no es sorprendente, ya que las dos neuronas de Retzius de cada ganglio están acopladas eléctricamente (Lent y Frazer, 1977). Sin embargo, la neurona contralateral (trazo gris) no pareció ser un simple seguidor de la ipsilateral (trazo negro), ya que sus potenciales de acción no estaban siempre en fase con los de la otra neurona (Fig. 29B), sino que algunas veces los precedían. Esto se sustentó mediante experimentos en otros ganglios inyectando pulsos de corriente en una neurona de Retzius y registrando el voltaje

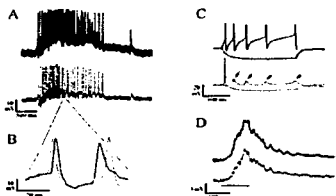


Figura 29. Ambas neuronas de Retzius de un ganglio responden a la estimulación mecánica de la piel. En A-D, los trazos negros son la respuesta de la neurona ipsilateral a la región de piel estimulada. La respuesta excitadora a la estimulación de la piel fue similar en ambas neuronas de Retzius de un ganglio. B, expansión de un segmento del registro mostrado en A. La neurona contralateral (trazo gris) no fue simplemente un seguidor de la actividad de la neurona ipsilateral, sino que algunas veces disparó antes, sugiriendo que la actividad es producida

por una entrada sináptica común. C, propagación de la corriente despolarizante e hiperpolarizante de una neurona a la otra. Después de la producción de potenciales de acción por la inyección de corriente despolarizante a una de las neuronas (trazos negros), la neurona seguidora (trazos grises) tuvo un bloqueo de la conducción y los potenciales de acción de la otra neurona fueron conducidos pasivamente (marcados por flechas negras), sugiriendo que el disparo sostenido de las neuronas de Retzius es producido por entradas sinápticas químicas. D, respuestas de un par de neuronas de Retzius a la estimulación mecanosensorial de la piel (la barra gris muestra la duración del estímulo) con las dos neuronas de Retzius hiperpolarizadas a -85 mV para evitar el disparo. La actividad sináptica registrada en las dos células fue similar pero no idéntica en amplitud y forma, sugiriendo una entrada común a ambas neuronas de Retzius. Tomado de Velazquez-Ulloa et al., 2003.

de ambas. Como se ve en la figura 29C, la corriente positiva o negativa se propagó a la neurona contralateral y cuando la despolarización alcanzó el umbral de disparo en la neurona estimulada, la secuencia de potenciales de acción no fue seguida por la neurona contralateral, que después de unos cuantos impulsos (uno en la figura), mostró bloqueo de conducción y los potenciales de acción producidos en la neurona estimulada fueron conducidos pasivamente a la acoplada (flechas negras; Eckert, 1963; Hagiwara y Morita, 1962). Esto sugirió que ambas neuronas de Retzius comparten una entrada sináptica común proveniente de las neuronas mecanosensoriales. Para probarlo, impedimos el disparo de las neuronas de Retzius, hiperpolarizándolas a -85 mV mediante inyección de corriente directa negativa. En estas condiciones, al pellizcar la piel ambas neuronas produjeron ráfagas de potenciales sinápticos, cuya amplitud y cinética fueron similares ($n= 6$ pares; Fig. 29D).

Correlación entre las respuestas de las neuronas sensoriales y las neuronas de Retzius

Para explorar cuáles de las neuronas mecanosensoriales tienen mayor efecto en el disparo de las neuronas de Retzius, registramos las respuestas de ambos tipos de células a la estimulación de la piel. La figura 30 resume resultados de 19 experimentos hechos con dobles o triples registros combinados de neuronas mecanosensoriales y de Retzius. Las células T respondieron a los estímulos táctiles suaves con trenes de potenciales de acción de alta frecuencia, seguidos por EPSPs y ocasionalmente potenciales de acción en las neuronas de Retzius (Fig. 30A). Las

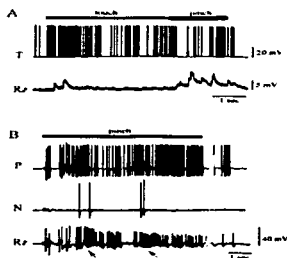


Figura 30. Registros simultáneos de las respuestas de las neuronas mecanosensoriales y de Retzius a la estimulación de la piel. A, el roce de la piel produjo un tren de potenciales de acción a alta frecuencia en una célula T y potenciales sinápticos en la neurona de Retzius. Un pellizco en la piel produjo una respuesta a alta frecuencia en la célula T al inicio del estímulo, seguido por una disminución de la frecuencia de disparo durante el estímulo y una respuesta a la terminación del estímulo. La neurona de Retzius tuvo una ráfaga de EPSPs durante la disminución de la actividad de la célula T. B, registros simultáneos de neuronas P, N y Retzius durante un pellizco. La neurona de Retzius disparó durante las respuestas de la célula P e incrementó su tasa de disparo (flechas) después de la actividad en la célula N. Tomado de Velázquez-Ulloa et al., 2003.

Retzius durante un pellizco. La neurona de Retzius disparó durante las respuestas de la célula P e incrementó su tasa de disparo (flechas) después de la actividad en la célula N. Tomado de Velázquez-Ulloa et al., 2003.

neuronas de Retzius no siguieron la respuesta sostenida de las células T. En cambio, un pellizco a la piel produjo respuestas "on" y "off" de alta frecuencia en las células T (Nicholls y Baylor, 1968), con una respuesta tónica de baja frecuencia entre ellas. En estos casos, la frecuencia de disparo de las neuronas de Retzius varió de manera inversa a la de las células T.

La activación de las neuronas de Retzius correlacionó principalmente con la de las células P (Fig. 30B), que respondieron antes o ligeramente después que las neuronas de Retzius, y ambos tipos neuronales dispararon a lo largo del estímulo e incluso después. En contraste, las células N dispararon sólo a bajas frecuencias, después de uno o más segundos (Pinato y Torre, 2000). Las respuestas de las neuronas P y de Retzius tuvieron su máximo durante la actividad de las células N (flechas en Fig. 30B) sin que esto signifique que fue a causa de ellas.

Estos resultados sugirieron que la actividad eléctrica de las neuronas de Retzius se induce por entradas sinápticas bilaterales de los tres tipos de neuronas mecanosensoriales en el ganglio, reflejando la información mecanosensorial de la pared corporal. Este estudio se amplió en la tesis de Norma Velázquez-Ulloa, registrando las respuestas de las células de Retzius a la estimulación intracelular de los tres tipos de neuronas mecanosensoriales. En él se confirmó ésta hipótesis y se demostró que las vías de entrada a las neuronas de Retzius son polisinápticas en todos los casos. Además se demostró que las entradas sinápticas están posiblemente en las dendritas no acopladas de las neuronas de Retzius (Velázquez-Ulloa et al., 2003).

DISCUSIÓN

Este trabajo muestra que las neuronas de Retzius liberan serotonina desde terminales presinápticas, y desde el soma. Mientras que la liberación sináptica ocurre tanto a partir de vesículas claras como de núcleo denso, la secreción somática está restringida a vesículas de núcleo denso. La liberación sináptica se activa con un solo impulso y ante trenes de impulsos incrementa su eficiencia en función de la frecuencia; la secreción somática requiere trenes de impulsos y es una función sigmoideal de la frecuencia. Los canales de calcio de tipo L participan en la liberación de serotonina a altas frecuencias tanto en la sinapsis como en el soma. La liberación de calcio inducida por calcio favorece la secreción somática y aparentemente limita el curso temporal de la secreción sináptica.

Secreción somática en las neuronas de Retzius

El incremento en la fluorescencia de la membrana somática después de un tren de impulsos a 20 Hz en presencia de FM1-43 indica que el soma está llevando a cabo exocitosis, ya que el colorante se une a las vesículas que se fusionan con la membrana, incrementando la fluorescencia total (Smith y Betz, 1996; Kilic et al., 2001). Este incremento duró más de 3 minutos en algunas neuronas, sugiriendo que un tren de impulsos puede desencadenar exocitosis y endocitosis prolongadas, similar a la de las células endocrinas excitables, donde la secreción se mantiene por periodos similares, aún después de que la $[Ca^{2+}]_i$ ha regresado a su nivel basal (Penner y Neher, 1988; Heinemann et al., 1993). El gran tamaño de estas neuronas dificulta la medición de los cambios en la capacitancia membranal para determinar eventos secretores, porque la capacitancia basal es muy alta. Sin embargo, intentamos medir cambios en la capacitancia de las neuronas de Retzius a partir de los cambios en la amplitud del voltaje aplicando ondas senoidales de corriente con una frecuencia suficientemente alta para que la corriente fluyera principalmente por el capacitor de la membrana (ver Gillis, 1995). Aunque en estos experimentos la alta capacitancia basal de las neuronas de Retzius dificultó la medición de cambios pequeños de capacitancia, el curso temporal de los incrementos que observamos fue similar al del incremento en la fluorescencia, como se ha visto en células endocrinas después de la estimulación (Smith and Betz, 1996; Kilic, 2002).

El lavado del colorante de la superficie externa de la membrana reveló un patrón de puntos fluorescentes bien delimitados en la superficie de las neuronas. Los puntos se destiñeron de manera dependiente de Ca^{2+} y de la despolarización, sugiriendo que son zonas de exocitosis y endocitosis. Como las características de los puntos fueron similares en todas las condiciones mientras que su número dependió de la frecuencia de disparo y de la presencia de Ca^{2+} extracelular, el número de puntos parece reflejar la cantidad de exocitosis en respuesta a la estimulación.

Mediante amperometría con fibra de carbono se han mostrado eventos secretores cuánticos en el soma de neuronas de Retzius tratadas con ionomicina (Bruns et al., 2000). La similitud entre los patrones de tinción de las neuronas de Retzius estimuladas en cultivo y en el ganglio sugiere que la secreción somática es fisiológica. El soma de las neuronas de Retzius

parece estar bien adaptado para esta función, ya que su gran superficie membranal permite la secreción masiva de serotonina a partir de grandes cantidades de vesículas secretoras en períodos cortos. Aunque el método que utilizamos en este trabajo para analizar la exo- y endocitosis somática no permitió seguir su curso temporal, sí permitió visualizar la secreción somática global y resultó ser un buen bioensayo para estudiar su regulación.

A primera vista, el patrón de tinción punteado de las neuronas de Retzius es similar al patrón fluorescente de FM1-43 observado en lactotropos (Angleson et al., 1999) y en células acinares pancreáticas (Giovannucci et al., 1998). Sin embargo, mientras que en los lactotropos cada punto fluorescente es producido por un gránulo de secreción individual de gran tamaño (Angleson et al., 1999), en las neuronas de Retzius el tamaño, la asimetría y los perfiles de intensidad de los puntos fluorescentes sugieren que cada punto está formado por un grupo de vesículas. La calibración con microesferas fluorescentes de diámetro conocido muestra que el tamaño de los puntos de FM1-43 está dentro del rango de resolución del microscopio confocal, por lo que no se debe a la dispersión de la luz a partir de vesículas individuales de 100 nm. Cada punto fluorescente, entonces, parece representar una zona de eventos secretores y endocíticos múltiples. Esta hipótesis multivesicular es además apoyada por el desteñido gradual de los puntos durante la despolarización.

La microscopía electrónica, que muestra cúmulos de vesículas de núcleo denso en el soma de las neuronas de Retzius (Fig. 7; ver también Bruns et al., 2000), apoya también la posibilidad de que los puntos fluorescentes estén formados por grupos de vesículas. La captura de peroxidasa dentro de las vesículas somáticas en neuronas de Retzius estimuladas a altas frecuencias (H. Hernández, M.A. Morales y F.F. De-Miguel, observaciones inéditas), junto con la formación de puntos fluorescentes, sugiere que la exocitosis y la endocitosis de los cúmulos vesiculares ocurren en el mismo sitio, manteniendo la estructura de los cúmulos, y formando zonas activas de ultraestructura distinta a la sináptica, de modo que los cúmulos vesiculares actuarían como unidades funcionales para la secreción y la endocitosis somáticas. En algunas células endocrinas, como las β pancreáticas, las vesículas se agrupan en zonas cercanas a las áreas membranales que tienen cúmulos de canales de calcio, y la secreción ocurre únicamente en estas zonas (Bokvist et al., 1995; Quián et al., 2001). Es posible suponer que en las neuronas de Retzius existan también cúmulos de canales de calcio en el soma, que favorezcan la secreción en sitios discretos, dando lugar a los puntos fluorescentes de FM1-43. También la

endocitosis simultánea de grupos vesiculares ocurre en células β pancreáticas (Eliasson et al., 1996), melanotropos (Thomas et al., 1990) y células cromafines (Neher y Marty, 1982). En terminales neuromusculares de serpiente también hay zonas activas para la endocitosis (Teng et al., 1999). El mantenimiento de la estructura de los cúmulos vesiculares apoyaría la posibilidad de un mecanismo tipo "Kiss and Run" (ver Palfrey y Artalejo, 1998) en la secreción somática. La aparición del patrón de puntos fluorescentes (aunque con una densidad mucho menor), aún con estimulación a bajas frecuencias o en presencia de Mg^{2+} , apoya que los cúmulos pueden ser unidades funcionales incluso para la secreción espontánea. La tinción basal observada en estas condiciones podría reflejar secreción y/o endocitosis constitutivas, que ocurren en ausencia de estimulación y de calcio extracelular.

La re-estimulación en presencia de FM1-43 después de una primera tinción, mostró que algunos de los puntos previamente observados se vuelven a teñir, otros desaparecen, algunos más permanecen sin volver a teñirse, y aparecen puntos nuevos. Esto sugiere que hay un movimiento dinámico de los grupos de vesículas ante la estimulación. La microscopía electrónica (H. Hernández, M.A. Morales y F.F. De-Miguel, sin publicar) apoya que los cúmulos de vesículas electrodensas en el soma se movilizan desde regiones internas del citoplasma hacia la membrana ante la estimulación. Suponemos entonces que el reclutamiento de puntos fluorescentes con incrementos en la frecuencia de disparo, se debe a la exocitosis de un número mayor de cúmulos gracias a su movilización desde sitios citoplásmicos hacia la membrana, como sucede con los gránulos de secreción en las células cromafines (Steyer y Almers, 1999).

El diámetro promedio de los cúmulos de vesículas de núcleo denso en las micrografías electrónicas es de 630 nm, mientras que los puntos fluorescentes de FM1-43 tienen 1.2 μ m de diámetro. La diferencia en el tamaño podría deberse a la forma en que las vesículas se distribuyen para fusionarse con la membrana, probablemente extendiendo el cúmulo conforme se acerca a la membrana y haciendo que ocupe un área mayor. Además, las imágenes de fluorescencia, aunque son confocales, no fueron procesadas por deconvolución, y pueden tener dispersión de luz fuera de foco que podría causar una sobreestimación del diámetro real de los puntos fluorescentes.

Dependencia de la frecuencia para la secreción somática

En contraste con la secreción sináptica en estas neuronas, que se activa incluso con impulsos sencillos (Dietzel et al., 1986; Stewart et al., 1989), la activación de la secreción somática requiere de trenes de impulsos a frecuencias de 5 Hz o mayores, de manera similar a la secreción endocrina (Zorec et al., 1991; Ämmälä et al., 1993). Esto ocurre también en general para la liberación de péptidos y co-transmisores a partir de vesículas de núcleo denso en distintas terminales sinápticas y células neurosecretoras (Cazalis et al., 1985; Whim y Lloyd, 1989; Hökfelt, 1991; Leenders et al., 1999).

La secreción somática fue una función sigmoideal de la frecuencia, cuya forma sugiere la cooperación de varios factores en su activación. La dependencia de la frecuencia para la secreción somática proviene presumiblemente de la distancia entre las vesículas y los canales de calcio, que hace necesario incrementar la entrada y la difusión del calcio para promover el transporte y fusión de las vesículas con la membrana. La baja densidad de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en el soma de las neuronas de Retzius en comparación con el muñón y las regiones presinápticas (Fernández de Miguel et al., 1992) puede contribuir a esta dependencia. Todo esto hace que un solo potencial de acción o trenes a baja frecuencia durante los cuales la $[Ca^{2+}]_i$ puede regresar al nivel basal, no incrementen suficientemente la $[Ca^{2+}]_i$ para activar la secreción. Ésta sólo se activa con trenes de impulsos a frecuencias que permitan la acumulación del calcio residual entre ellos (Heinemann et al., 1993). En células β pancreáticas (Ämmälä et al., 1993) y en melanotropos (Thomas et al., 1990) dicha acumulación de calcio "facilita" la secreción endocrina ante trenes de despolarizaciones.

Otro factor que contribuye a la secreción en células endocrinas es la liberación de calcio inducida por calcio, que actúa como un mecanismo de retroalimentación positiva que incrementa y mantiene la secreción (Cheek et al., 1990; Guo et al., 1996; Tse et al., 1997; Lemmens et al., 2001; Kang y Holz, 2003). La microscopía electrónica en el soma de las neuronas de Retzius (V.H. Hernández, M.A. Morales y F.F. De-Miguel, resultados sin publicar) muestra una gran cantidad de retículo endoplásmico liso, casi en contacto con la membrana plasmática, apoyando que en estas neuronas pudiera haber un mecanismo similar. Efectivamente, el bloqueo de los receptores de rianodina redujo la secreción somática en un 42%, mientras que la incubación con cafeína en ausencia de Ca^{2+} extracelular la estimuló. A todos estos factores hay que agregar

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

que la endocitosis también puede depender de calcio (von Gersdorff y Matthews, 1994; Eliasson et al., 1996; Kasai et al., 1996; Engisch et al., 1998) y por lo tanto de la frecuencia de disparo, contribuyendo a la relación sigmoidal del número de puntos fluorescentes con la frecuencia.

La reducción hasta niveles basales de la secreción somática en presencia de nimodipina, sugiere que la mayor parte de los canales de calcio que acoplan la excitación con la secreción en el soma son de tipo L, lo cual es también similar a los mecanismos de las células endocrinas excitables (Davalli et al., 1996; Villalobos et al., 1997) y se distingue de la secreción sináptica, en la que por lo general predominan otros tipos de canales, como los N, T, ó P/Q (para revisión ver Reuter, 1996).

El análisis de los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ en las neuronas de Retzius ha mostrado que la entrada de Ca^{2+} al soma ocurre al menos en parte a través de canales de tipo L (Beck et al., 2001). Las células endocrinas, además de estos canales, tienen una contribución de otros tipos de canales de calcio como los N, P ó Q al acoplamiento excitación-secreción (Davalli et al., 1996; Lukyanetz y Neher, 1999). En células cromafines, por ejemplo, los canales de calcio de tipo L producen una secreción mayor y más rápida que los canales tipo P y N, pero éstos últimos también participan en la secreción (Artalejo et al., 1994; Elhamdani et al, 1998). En nuestros experimentos, durante despolarizaciones largas con alto K^+ la nimodipina no bloqueó completamente la secreción somática, sugiriendo la participación de otros tipos de canales ante estimulaciones más prolongadas. La falta de efecto de los bloqueadores de canales tipo N, P y Q en este estudio puede deberse a la insensibilidad de estas neuronas, como ocurre con otras toxinas bloqueadoras de canales dependientes de voltaje (Johansen y Kleinhaus, 1986). Por ello, no podemos descartar la presencia de otros tipos de canales de calcio y su contribución a la secreción somática.

La secreción somática ocurre también en otras neuronas (Chen et al., 1995; Huang y Neher, 1996; Zaidi y Matthews, 1997, 1999; Jaffe et al., 1998; Puopolo et al., 2000), que liberan, a partir de vesículas de núcleo denso, catecolaminas y/o neuropéptidos, los cuales, como la serotonina, actúan como neuromoduladores a través de receptores metabotrópicos. En vista de estas similitudes, es posible que las aminas biogénicas y neuropéptidos, que actúan como moduladores lentos, sean susceptibles de liberarse por el soma neuronal y modular de manera parácrina las respuestas de las células vecinas. La dependencia de la frecuencia en la secreción

somática no ha sido estudiada en ninguna otra de estas neuronas.

Secreción sináptica de serotonina

Las terminales sinápticas de muchos tipos neuronales tienen tanto vesículas claras como vesículas de núcleo denso. En muchos casos, las primeras contienen transmisores de bajo peso molecular y las segundas co-transmisores peptídicos (Lundberg et al., 1981; Fried et al., 1985; Bloom et al., 1987; 1989; Bean y Roth, 1991; Hökfelt, 1991; Whim y Lloyd, 1989). En aferentes simpáticas del bazo, por ejemplo, las vesículas claras contienen noradrenalina y las electrodensas contienen neuropéptido Y. En estas sinapsis se ha mostrado que la estimulación a bajas frecuencias produce la liberación de noradrenalina, mientras que a altas frecuencias se libera el péptido (Lundberg et al., 1986). Con base en estas evidencias se ha propuesto que la liberación del contenido de vesículas claras ocurre a frecuencias bajas, mientras que las vesículas de núcleo denso requieren altas frecuencias de disparo para exocitar (Dutton y Dyball, 1979; Lundberg y Hökfelt, 1983; Hökfelt, 1991). Las neuronas de Retzius, son representativas de este tipo de terminales, ya que también contienen ambos tipos de vesículas, pero en este caso ambas contienen serotonina (Kuffler et al., 1987; Bruns et al., 2000).

La liberación sináptica de serotonina en las neuronas de Retzius se activó con impulsos únicos (Fuchs et al., 1982; Henderson et al., 1983) y en condiciones fisiológicas los trenes de estimulación de baja frecuencia dieron lugar a secreción sináptica estable a lo largo del tren. Al incrementar la frecuencia del tren presináptico la secreción sináptica pareció mostrar dos componentes dependientes de la frecuencia: uno que se facilita a frecuencias bajas y se agota a partir de 5 Hz y otro que se recluta más lentamente a frecuencias altas y tiende a la saturación. El primer incremento rápido podría deberse a la facilitación de la liberación a partir de vesículas claras. Estas se deprimirían a partir de 5 Hz, y el segundo incremento podría deberse al reclutamiento de vesículas de núcleo denso, con un umbral más alto que el primero, y que permitiría una recuperación y mantenimiento de la liberación a frecuencias altas.

Registros amperométricos en estas neuronas han mostrado que la liberación ante pulsos pareados a bajas frecuencias es principalmente a partir de vesículas claras (Bruns y Jahn, 1995). El incremento de la liberación en función de la frecuencia sugiere el reclutamiento de más vesículas de este tipo, produciendo facilitación a frecuencias entre 1 y 5 Hz, ya que el incremento

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en la frecuencia permitiría la acumulación de calcio en la terminal presináptica, dando lugar a liberación con una dependencia no lineal con respecto a la concentración de calcio (Dodge y Rahamimoff, 1967; Smith et al., 1985). Por ello, creemos que el incremento inicial en esta relación se podría expresar matemáticamente con una función potencial del tipo: $I = K (f_{(x)})^n$, similar a la que explica la liberación de transmisor en función de la concentración de calcio en la placa neuromuscular (Dodge y Rahamimoff, 1967), donde I es el índice de liberación, K es una constante de proporcionalidad, y $f_{(x)}$ es una función de la concentración de calcio, que explica la cinética de unión de este ion a las moléculas que producen la liberación. En nuestro caso, $f_{(x)}$ debería ser una función de transferencia entre la frecuencia de disparo y la entrada de calcio a la terminal, que produce a su vez la liberación a partir de una poza disponible de vesículas, y la regulación de ésta mediante la movilización de vesículas de la poza de reserva. La función es además una normalización de la liberación a partir de vesículas claras y de núcleo denso. La potencia a la n en esta función determina un umbral al inicio de la curva (Dodge y Rahamimoff, 1967), que en este caso sería el límite entre la liberación estable que ocurre a frecuencias ≤ 1 Hz (un índice de liberación de 1) y el inicio de la facilitación sináptica.

La actividad sostenida en sinapsis químicas con vesículas claras produce su depresión debido al agotamiento de la poza liberable (Schneppenburger et al., 1999; Weis et al., 1999). Es posible entonces que la fase de disminución de la liberación que ocurre entre 5 y 10 Hz se deba al agotamiento de la poza de vesículas claras, al sobrepasarse la capacidad de recuperación de la poza. Esta fase podría entonces ser explicada con otra función del mismo tipo, que se le resta a la primera.

Dado que las terminales sinápticas de las neuronas de Retzius contienen tanto vesículas claras como de núcleo denso, suponemos que a altas frecuencias la secreción incorpora a las segundas, como se ha propuesto en otras sinapsis donde coexisten ambos tipos vesiculares (Dutton y Dyball, 1979; Lundberg y Hökfelt, 1983; Hökfelt, 1991). Registros amperométricos en las neuronas de Retzius muestran que la probabilidad de liberación a partir de vesículas electrodensas aumenta a lo largo de trenes de tres impulsos (Bruns y Jahn, 1995), apoyando esta hipótesis. La recuperación del índice de liberación a frecuencias mayores de 10 Hz sugiere entonces el reclutamiento de vesículas de núcleo denso, que posiblemente comienza con un umbral de frecuencia mayor que el componente de las vesículas claras y se comporta de manera parecida a la liberación en el soma. Por ello, creemos que esta parte de la curva podría ser

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

explicada por una función logística, del mismo tipo que el que encontramos para la liberación somática. El inicio de la liberación a partir de vesículas electrodensas se empalmaría con la fase de depresión de las vesículas claras y permitiría sostener la liberación ante ráfagas de impulsos a altas frecuencias aún cuando la poza de vesículas claras estuviera deprimida.

Al incrementar la probabilidad de liberación, aumentando la concentración extracelular de calcio, se produjo depresión a bajas frecuencias (Dietzel et al., 1986), similar a la sinapsis del cáliz de Held (Meyer et al., 2001). Esto se debe a que el incremento en el número de cuantos liberados reduce más rápidamente la poza liberable, que no se recupera a lo largo del tren (Schneggenburger et al., 1999; Weis et al., 1999). Al incrementar la frecuencia del tren presináptico, la eficiencia de liberación aumentó y alcanzó la facilitación, sugiriendo el reclutamiento de una segunda poza de vesículas, posiblemente las electrodensas (Bruns y Jahn, 1995). La facilitación disminuyó cuando la frecuencia de disparo fue de 50 Hz, sugiriendo el agotamiento de esta segunda poza. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la liberación en función de la frecuencia es una combinación del contenido de vesículas claras y de núcleo denso que se activan de manera diferente en función de la frecuencia.

La eliminación de la facilitación en presencia de nimodipina en condiciones de alta probabilidad de liberación sugiere que este componente de liberación sináptica procede de vesículas acopladas a canales de tipo L. La dependencia de este tipo de canales de calcio en la facilitación es parecida a la que ocurre en neuronas hipocámpales para la liberación de GABA (Jensen y Mody, 2001; Murakami et al., 2002) y en la vejiga urinaria para la liberación de acetilcolina y noradrenalina (Somogyi et al., 1997) a altas frecuencias de estimulación. Por su dependencia de la frecuencia y farmacología, el componente de liberación sináptica que causa la facilitación en las neuronas de Retzius pudiera ser análogo al somático, y provenir de vesículas de núcleo denso, de modo que la sinapsis desde el punto de vista estructural y funcional parece tener dos componentes que operan con relativa independencia entre sí: uno con vesículas claras asociado a otros tipos de canales, y otro con vesículas de núcleo denso, asociado a canales de calcio de tipo L.

A pesar de que en muchas neuronas se ha descrito la presencia de depósitos intracelulares de calcio e incluso su participación en la generación de señales postsinápticas en las dendritas (Llano et al., 1991; Kano et al., 1995; Emptage et al., 1999; Sun et al., 2000), su

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

papel en la liberación de neurotransmisor en las terminales presinápticas se ha estudiado poco (Smith y Cunane, 1996; Llano et al., 2000; Emptage et al., 2001). La presencia de reservorios intracelulares de calcio en terminales presinápticas sugirió que funcionalmente, la liberación de calcio de estos compartimentos pudiera tener efectos similares a los somáticos y a los de neuronas parasimpáticas, cerebelares e hipocampales, en donde la liberación de calcio de depósitos intracelulares favorece la liberación de transmisor (Smith y Cunane, 1996; Llano et al., 2000; Emptage et al., 2001). Sin embargo, a diferencia del soma, donde el acoplamiento funcional entre el calcio transmembranal y el intracelular favorecen la secreción, en las terminales sinápticas de las neuronas de Retzius encontramos un mecanismo más complejo.

El efecto reductor de la rianodina en la hiperpolarización postpotencial es similar al descrito en aferentes gastrointestinales (Hillsley et al., 2000), neuronas parasimpáticas (Jobling et al., 1993; Sah y Mclachlan, 1997) e hipocampales (Lancaster y Zucker, 1994; Torres et al., 1996), en las que hay un acoplamiento entre estos reservorios y los canales de potasio dependientes de calcio, ya que el bloqueo de la liberación intracelular de calcio evita la activación de éstos y por lo tanto de la hiperpolarización postpotencial. Sin embargo, a pesar del efecto directo del calcio intracelular sobre la actividad eléctrica de estas neuronas, no se conoce cómo afecta esto a la liberación de transmisor. Dado que el bloqueo de la liberación intracelular de calcio en las neuronas de Retzius se acompaña de un alargamiento del potencial sináptico, nuestros resultados sugieren que el calcio intracelular repolariza la neurona y reduce la entrada de calcio, determinando el curso temporal de la liberación de transmisor.

La despolarización postpotencial producida por la rianodina en la neurona presináptica fue de hasta 20 mv ante trenes de impulsos. Dado que en esta sinapsis la disminución del potencial de membrana presináptico produce un incremento en la liberación cuántica de serotonina (Dietzel et al., 1986), esto puede de causar una despolarización de alrededor de 1 mv en la célula postsináptica, similar a la que ocurrió en nuestros experimentos.

El alargamiento en el potencial sináptico a altas frecuencias pudiera deberse, al menos en parte, a un efecto del calcio que sigue entrando a la terminal sobre la liberación a partir de vesículas electrodensas. La posibilidad de que los canales de calcio de tipo L, que tienen poca inactivación por voltaje (Nowycky et al., 1985a), participen en la liberación de transmisor en estas sinapsis, como ocurre en neuronas con respuestas fisiológicas graduadas y sostenidas,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

como los fotorreceptores y las células bipolares de la retina (Schmitz y Witkovsky, 1997), podría explicar el alargamiento de la liberación de neurotransmisor que ocurre al bloquear los receptores de rianodina. Es posible entonces proponer un acoplamiento entre los reservorios intracelulares de calcio, los canales de calcio de tipo L y los canales de potasio dependientes de calcio, que juntos determinan el curso temporal de la liberación de serotonina en las sinapsis. El curso temporal del potencial sináptico puede tener consecuencias importantes en la integración de la información que lleva a cabo la neurona postsináptica, ya que las señales rápidas son más filtradas por la membrana y por ello se propagan menos eficientemente (Rall, 1969), reduciendo su posible suma temporal.

Aunque nuestros experimentos no permiten distinguir si hubo una contribución de éste tipo, la liberación de calcio inducida por calcio antes de promover la hiperpolarización podría también tener un efecto rápido sobre la liberación de transmisor. El efecto del bloqueo de la liberación de calcio ocurre ante un solo impulso, a diferencia del efecto de los canales tipo L, que se ve únicamente con trenes de altas frecuencias, lo cual sugiere que la liberación de calcio de los depósitos intracelulares podría actuar a bajas frecuencias sobre la liberación del contenido de vesículas claras y a altas frecuencias podría además contribuir a la movilización de vesículas de núcleo denso desde la poza de reserva hacia la poza liberable (Wang y Kaczmarek, 1998). Por otro lado, la hiperpolarización postpotencial causada por el calcio intracelular también tendería a reducir la frecuencia de disparo, de modo que a largo plazo regularía negativamente ambos tipos de liberación.

La diferencia en la función de los depósitos intracelulares de calcio en la sinapsis y en el soma de la misma neurona es una consecuencia interesante de la distribución diferencial que tienen los distintos tipos de canales iónicos en distintas áreas de la membrana. Esta diferencia correlaciona con la distribución de los canales de K^+ dependientes de calcio en las neuronas de Retzius, detectadas con la técnica de "loose patch clamp" (F.F. De-Miguel, resultados sin publicar).

Regulación de la frecuencia de disparo por entradas sinápticas a las neuronas de Retzius

La estimulación mecanosensorial de la piel produjo potenciales postsinápticos excitadores y potenciales de acción en ambas neuronas de Retzius del ganglio. La frecuencia y la duración de las respuestas dependieron de la fuerza y la duración de la estimulación a la piel, pero se alcanzaron frecuencias de disparo de hasta 50 Hz en las neuronas de Retzius, similares a las que activan la secreción somática de serotonina. Por ello es probable que la estimulación de las vías sensoriales en la piel de la sanguijuela sea uno de los mecanismos fisiológicos de activación de la secreción somática. Las neuronas de Retzius respondieron después que las células T y P, pero antes que las N y su actividad sostenida correlacionó con la actividad de las células P, sugiriendo que éstas son las principales inductoras del disparo a altas frecuencias. La falta de correlación entre el disparo de las células T y las Retzius sugiere que las células T podrían contribuir a las respuestas de las neuronas de Retzius al principio de los estímulos, pero la actividad sostenida de las neuronas de Retzius debe provenir de las entradas sinápticas de otros tipos neuronales.

Recientemente se mostró que las conexiones de todas las células mecanosensoriales a las células de Retzius son polisinápticas y ocurren posiblemente en las dendritas no acopladas de las

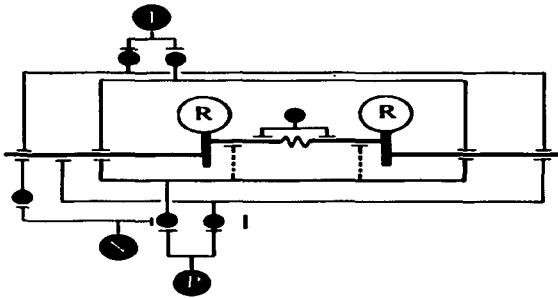


Figura 31. Representación esquemática del circuito hipotético que regula la actividad de las neuronas de Retzius. Las neuronas mecanosensoriales T, P y N ipsilaterales se conectan con más de una interneurona (I), que a su vez forma contactos a distintas distancias con las dendritas no acopladas de ambas neuronas de Retzius (R) en cada ganglio. Podrían existir también algunos contactos con las dendritas acopladas (flechas punteadas).

Las neuronas P y N tienen vías independientes y también convergen sobre interneuronas comunes. Las distancias de las conexiones con las neuronas de Retzius son arbitrarias. Todas las dendritas de las neuronas de Retzius se conectan con el axón primario, donde se lleva a cabo la integración. Esta vía controla las respuestas de alta frecuencia en las neuronas de Retzius que producen la secreción somática de serotonina. Las entradas no definidas en las dendritas acopladas (centro del esquema) producen potenciales sinápticos espontáneos, responsables del disparo a baja frecuencia que produce principalmente secreción sináptica de serotonina. Tomado de Velázquez-Ulloa et al., 2003.

neuronas de Retzius (Fig. 31; Velázquez-Ulloa et al., 2003). Esto está en contraste con la actividad producida en las dendritas acopladas, donde las entradas sinápticas provenientes de neuronas todavía no identificadas producen principalmente actividad de baja frecuencia (De-Miguel et al., 2001), asociable básicamente a la liberación de serotonina en las terminales presinápticas. Entonces, dependiendo de las entradas sinápticas que recibe la neurona, se pueden producir distintos patrones de disparo y activar uno u otro modo de liberación de serotonina, teniendo efectos distintos sobre circuitos neuronales en el sistema nervioso.

Posible significado funcional de los distintos modos de secreción en las neuronas de Retzius

Las diferencias en la cantidad de serotonina liberada y su regulación en la sinapsis y en el soma indican que las neuronas pueden tener un comportamiento bimodal: como neuronas clásicas, liberando neurotransmisor desde las terminales presinápticas y como células endocrinas, liberando moduladores a partir del soma. El tipo de liberación que se activa depende de la frecuencia de disparo de la neurona, que a su vez depende de las entradas sinápticas que ésta recibe. Además, debido a que las neuronas de Retzius tienen autorreceptores para serotonina, que en su mayoría activan corrientes de cloro (Lessman y Dietzel, 1991), la misma serotonina podría regular la frecuencia de disparo de las neuronas que la secretan y de esta manera regular su propia secreción. Lo mismo ocurre en las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del raphé en los vertebrados (Frazer y Hensler, 1994).

La secreción somática es similar a la secreción en células endocrinas excitables y distinta de la liberación sináptica de neurotransmisor. Hay grandes diferencias entre ambas en términos de la dependencia de la frecuencia de disparo, los mecanismos de regulación y las cantidades de serotonina liberadas por cada mecanismo. A primera vista, el comportamiento semilogarítmico es distinto del somático, que no se activa con impulsos sencillos ni a frecuencias menores de 5 Hz, y es una función sigmoideal de la frecuencia. Sin embargo, no es posible hacer una comparación directa debido a que los métodos utilizados para estudiar la secreción sináptica y la somática fueron diferentes. Mientras que las respuestas postsinápticas son un reflejo directo de la cantidad de serotonina liberada, la secreción somática se analizó a partir de la endocitosis y el método tiene una sensibilidad diferente. Sin embargo, es posible suponer que ésta ocurre como consecuencia de la exocitosis y el número de puntos refleja la cantidad de secreción.

La cantidad de contenidos vesiculares que se liberan en la sinapsis puede ser estimada conociendo la respuesta postsináptica a la liberación de un cuanto de serotonina, que es de 0.15 mV, calculada con análisis de ruido (Dietzel et al., 1986) y con el análisis cuántico de los potenciales miniatura (Henderson et al., 1983). Como las respuestas postsinápticas a un impulso presináptico son de unos cuantos milivoltios (alrededor de 5 mV o menos, variando entre preparaciones), esto representa la liberación de unas pocas decenas de cuantos. En contraste, el soma contiene cúmulos con alrededor de 30 de vesículas de núcleo denso cada uno. La tinción de 90 puntos fluorescentes ante la estimulación con un tren de impulsos a 20 Hz, representaría la liberación de cerca de 2,700 contenidos vesiculares. Esto concuerda con resultados de experimentos preliminares en los que intentamos medir cambios en la capacitancia de las neuronas de Retzius. Aunque la baja relación señal/ruido en estos experimentos dificultó la medición de cambios pequeños de capacitancia, los cambios detectados ante un tren de 10 impulsos a 20 Hz correspondieron a la fusión de aproximadamente 7,500 vesículas. Además, las vesículas de núcleo denso, contienen 17 veces más moléculas de serotonina que las claras (Bruns y Jahn, 1995), lo que hace todavía más grandes las diferencias en la cantidad de serotonina liberada en el soma y en la sinapsis. Entonces, mientras que los botones sinápticos liberan pocos cuantos de neurotransmisor ante potenciales de acción únicos e incrementan su eficiencia con la frecuencia de disparo, el soma requiere trenes de impulsos a altas frecuencias y parece liberar grandes cantidades de serotonina.

En cuanto al efecto de cada tipo de secreción en el sistema nervioso, la liberación sináptica tiene efectos específicos y localizados. Aunque la liberación de contenidos de vesículas electrodensas puede ocurrir en zonas perisinápticas (Golding y Bayraktaroglu, 1984) y tener efectos parácrinos, la magnitud de este tipo de secreción hace que su acción sea más localizada que la de la secreción somática. Por ello, suponemos que los efectos de la liberación sináptica están restringidos a las terminales sinápticas y sus blancos inmediatos. En contraste, la secreción somática podría tener efectos más difusos y generalizados. A diferencia de los neurotransmisores con acciones directas como el glutamato y el GABA, la serotonina parece ejercer acciones principalmente parácrinas en varias áreas del sistema nervioso central (Bunin y Wightman, 1999). La liberación somática de serotonina pudiera ser la fuente de esta secreción parácrina, y por lo tanto la responsable de la modulación de las conductas social (Raleigh et al., 1991), sexual (Hull et al, 1999), alimenticia (Breisch et al., 1976; Saller y Stricker, 1976), o los patrones motores rítmicos (Jacobs y Fornal, 1993) en vertebrados, así como el nado (Kristan y

Nusbaum, 1983) y la alimentación (Lent y Dickinson, 1984; Zhang et al., 2000) en la sanguijuela. En resumen, la secreción somática podría modular circuitos enteros en el sistema nervioso y podría en general obedecer un mecanismo general de secreción extrasináptica.

CONCLUSIONES

1) La secreción de serotonina en las neuronas de Retzius es bimodal: las terminales presinápticas liberan serotonina en sitios especializados de contacto con otras neuronas, y el soma libera serotonina de manera masiva, como célula endocrina.

2) La secreción somática ocurre a partir de cúmulos de vesículas de núcleo denso que actúan como unidades funcionales de secreción. Esta se activa con altas frecuencias de disparo y es mediada principalmente por canales de calcio de tipo L. La liberación de calcio inducida por calcio participa en el soma como un factor de retroalimentación positiva que incrementa la secreción.

3) La secreción sináptica en condiciones fisiológicas se activa con bajas frecuencias, y se facilita con incrementos en la frecuencia de disparo presináptica. En condiciones de alta probabilidad de liberación, la secreción sináptica tiene dos componentes. A bajas frecuencias hay depresión y por encima de 5 Hz hay facilitación, que depende de canales de tipo L.

La liberación de calcio inducida por calcio activa una hiperpolarización postpotencial en la célula presináptica y reduce el tiempo de caída del potencial sináptico.

4) La secreción somática podría ser evocada por la estimulación mecanosensorial, que produce actividad de alta frecuencia en las neuronas de Retzius.

Las principales conclusiones de este trabajo se esquematizan en la figura 32.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTAMPADO EN LA
BIBLIOTECA

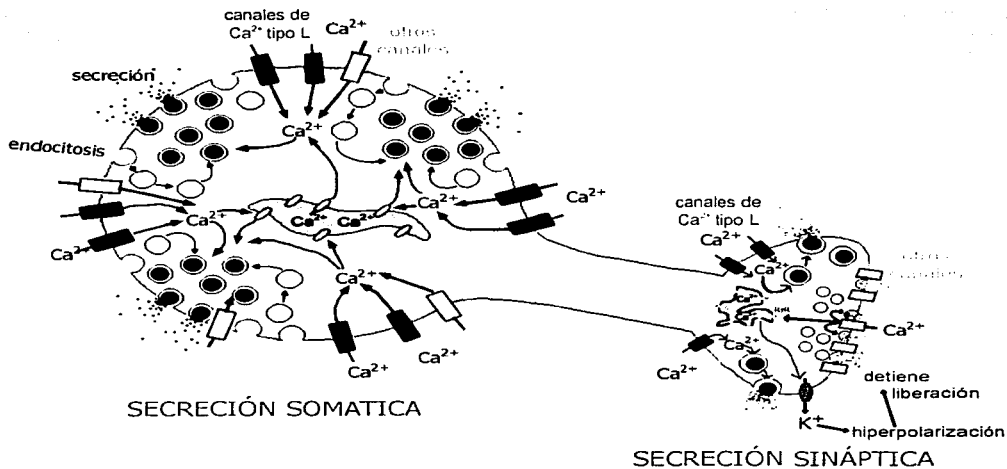


Figura 32. Representación esquemática de la secreción sináptica y somática en las neuronas de Retzius. En el soma, la estimulación a altas frecuencias produce la secreción a partir de vesículas de núcleo denso a través de la activación de canales de calcio de tipo L con una retroalimentación positiva de la liberación de calcio inducida por calcio. En las terminales presinápticas la liberación del contenido de vesículas claras es estimulada a bajas frecuencias de disparo y facilitada por el disparo a frecuencias altas. La activación de canales de calcio de tipo L a altas frecuencias participa en la facilitación de la secreción a partir de vesículas de núcleo denso. La liberación de calcio de depósitos intracelulares a través de receptores de rianodina (RyR), produce la hiperpolarización de la membrana y detiene la liberación de serotonina.

REFERENCIAS

- Agnati, L.F., Bjelke, B. & Fuxe, K. (1995) Volume versus wiring transmission in the brain: a new theoretical frame for neuropsychopharmacology. *Medical Research Reviews*, **15**, 33-45.
- Agnew, W.S. (1988) Excitation-contraction coupling. Proteins that bridge the gap. *Nature*, **334**, 299-300.
- Ämmälä, C., Eliasson, L., Bokvist, K., Larsson, O., Ashcroft, F.M. & Rorsman, P. (1993) Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic B-Cells. *Journal of Physiology*, **472**, 665-688.
- Angleson, J.K., Cochilla, A.J., Kilic, G., Nussinovitch, I. & Betz, W.J. (1999) Regulation of dense core release from neuroendocrine cells revealed by imaging single exocytic events. *Nature Neuroscience*, **2**, 440-446.
- Angstadt, J.D. & Friesen, W.O. (1993a) Modulation of swimming behavior in the medicinal leech I. Effects of serotonin on the electrical properties of swim-gating cell 204. *Journal of Comparative Physiology A*, **172**, 223-234.
- Angstadt, J.D. & Friesen, W.O. (1993b) Modulation of swimming behavior in the medicinal leech II. Ionic conductances underlying serotonergic modulation of swim-gating cell 204. *Journal of Comparative Physiology A*, **172**, 235-248.
- Arango, V., Underwood M. D. & Mann J. J. (2002) Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. *Progress in Brain Research*, **136**, 443-453.
- Artalejo, C.R., Adams, M.E. & Fox, A.P. (1994) Three types of Ca²⁺ channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature*, **367**, 72-76.
- Baccus, S.A. (1998) Synaptic facilitation by reflected action potentials: enhancement of transmission when nerve impulses reverse direction at axon branch points. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.* **95**, 8345-8350.
- Baylor, D.A. & Nicholls, J.G. (1971) Patterns of regeneration between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Nature, Lond*, **232**, 268-269.
- Bean, A.J. & Roth, R.H. (1991) Extracellular dopamine and neurotensin in rat prefrontal cortex in vivo: effects of median forebrain bundle stimulation frequency, stimulation pattern and,

dopamine autorreceptors. *Journal of Neuroscience* , **11**, 2694-2702.

Beck, A. & Lohr, C.D.J.W. (2001) Calcium transients in subcompartments of the leech Retzius neuron as induced by single action potentials. *Journal of Neurobiology*, **48**, 1-18.

Betz, W.J., Bewick, G.S. & Rige, R.M. (1992) Intracellular movements of fluorescently labeled synaptic vesicles in frog motor nerve terminals during nerve stimulation. *Neuron* , **9**, 805-813.

Blackshaw, S.E. & Nicholls, J.G. (1995) Neurobiology and development of the leech. *Journal of Neurobiology*, **27**, 267-276.

Blackshaw, S.E., Nicholls, J.G. & Parnas, I. (1988) Physiological responses, receptive fields and terminal arborizations of nociceptive cells in the leech. *Journal of Physiology (London)*, **326**, 251-260.

Block, B.A., Imagawa, T., Campbell, K.P. & Franzini-Armstrong, C. (1988) Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *Journal of Cellular Biology*, **107**, 2587-2600.

Bloom, S.R., Edwards, A.V. & Garrett, J.R. (1987) Effects of stimulating the sympathetic innervation in bursts on submandibular vascular and secretory function in cats. *Journal of Physiology (London)*, **393**, 91-106.

Bokvist, K., Eliasson, L., Ämmälä, C., Renstrom, E. & Rorsman, P. (1995) Co-localization of L-type Ca^{2+} channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic b-cells. *EMBO Journal*, **14**, 50-57.

Breisch, S.T., Zemlan, F.P. & Hoebel, B.G. (1976) Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science* , **192**, 382-385.

Brieden, T., Ujeyl, M. & Naber, D. (2002) Psychopharmacological treatment of aggression in schizophrenic patients . *Pharmacopsychiatry*, **35**, 83-89.

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

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

Bunin, M.A. & Wightman, R.M. (1999) Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of

5-HT. *Trends in Neuroscience*, **22**, 377-382.

Burrell, B.D., Sahley, C.L. & Muller, K.J. (2002) Differential effects of serotonin enhance activity of an electrically coupled neural network. *Journal of Neurophysiology*, **87**, 2889-2895.

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

Byrne, J.H., Baxter, D.A., Buonomano, D.V., Cleary, L.J., Eskin, A., Goldsmith, J.R., McClendon, E., Nazif, F.A., Noel, F. & Scholz, K.P. (1991) Neural and molecular bases of nonassociative and associative learning in *Aplysia*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **627**, 124-149.

Catterall, W.A. (1999) Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in release. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **868**, 144-159.

Cazalis, M., Dayanithi, G. & Nordmann, J.J. (1985) The role of patterned burst and interburst interval on the excitation-coupling mechanism in the isolated rat neural lobe. *Journal of Physiology (London)*, **369**,

Chadwick, C.C., Inui, M. & Fleischer, S. (1988) Identification and purification of a transverse tubule coupling protein which binds to the ryanodine receptor of terminal cisternae at the triad junction in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 10872-10877.

Chavis, P., Fagni, L., Lansman, J.B. & Bockaert, J. (1996) Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature*, **382**, 719-722.

Chazal, G. & Ralston, J.J.I. (1987) Serotonin-containing structures in the nucleus raphe dorsalis of the cat: an ultrastructural analysis of dendrites, presynaptic dendrites, and axon terminals. *Journal of Comparative Neurology*, **259**, 317-329.

Cheek, T.R., O'Sullivan, A.J., Moreton, R.B., Berridge, M.J. & Burgoyne, R.D. (1990) The caffeine-sensitive Ca²⁺ store in bovine adrenal chromaffin cells; an examination of its role in triggering secretion and Ca²⁺ homeostasis. *FEBS Letters*, **266**, 91-95.

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

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Chow, R.H. & von Rüden, L. (1995) Electrochemical detection of secretion from single cells. Single-channel recording (ed. by B. Sakmann and E. Neher), Plenum Press, New York.
- Cochilla A. J., Angleson, J.K. & Betz, W.J. (1999) Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. *Annual Review of Neuroscience*, **22**, 1-10.
- Coggeshall, R.E. (1972) Autoradiographic and chemical localization of 5-hydroxytryptamine in identified neurons in the leech. *Anatomical Records*, **172**, 489-498.
- Coggeshall, R.E. & Lekan, H.A. (1996) Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *Journal of Comparative Neurology*, **364**, 6-15.
- Dahlstrom, A. & Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, **20**, 398-399.
- Davalli, A.V., Biancardi, E., Pollo, A., Socci, C., Pontiroli, A.E., Pozza, G., Clementi, F., Sher, E. & Carbone, E. (1996) Dihydropyridine-sensitive and insensitive voltage-operated Ca^{2+} channels participate in the control of glucose-induced insulin release from human pancreatic beta cells. *Journal of Endocrinology*, **150**, 195-203.
- De-Miguel, F.F., Vargas-Caballero, M. & García-Pérez, E. (2001) Spread of synaptic potentials through electrical synapses in Retzius neurones of the leech. *Journal of Experimental Biology*, **204**, 3241-3250.
- Dierkes, P.W., Hochstrate, P. & Schlue, W.R. (1997) Voltage-dependent Ca^{2+} influx into identified leech neurones. *Brain Research*, **746**, 285-293.
- Dietzel, I.D., Dreapeau, P. & Nicholls, J.G. (1986) Voltage dependence of 5-hydroxytryptamine release at a synapse between identified leech neurones in culture. *Journal of Physiology (London)*, **372**, 191-205.
- Dixon, D. & Atwood, H. (1989) Cojoint action of phosphatidylinositol and adenylate cyclase systems in serotonin-induced facilitation at the crayfish neuromuscular junction. *Journal of Neurophysiology*, **62**, 1251-2159.
- Dodge, F.A. & Rahamimoff, R. (1967) Co-operative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *Journal of Physiology*, **193**, 419-432.
- Dun, N.J. & Minota, S. (1982) Post-tetanic depolarization in sympathetic neurones of the Guinea-

fig. *Journal of Physiology (London)*, **323**, 325-337.

Dutton, A. & Dyball, R.R.J. (1979) Phasic firing enhances vasopressin release from the rat neurohypophysis. *Journal of Physiology (London)*, **290**, 433-440.

Eckert, R. (1963) Electrical interaction of paired ganglion cells in the leech. *Journal of General Physiology*, **46**, 573-587.

Ehrlich, J.S., Boulis, N.M., Karrer, T. & Sahley, C.L. (1992) Differential effects of serotonin depletion on sensitization and dishabituation in the leech, *Hirudo medicinalis*. *Journal of Neurobiology*, **23**, 270-279.

Elhamdani, A., Zhou, A. & Artalejo, C.R. (1998) Timing of dense-core vesicle exocytosis depends on the facilitation L-type Ca channel in adrenal chromaffin cells. *Journal of Neuroscience*, **18**, 6230-6240.

Eliasson, L., Proks, P., Ämmälä, C., Ashcroft, F.M., Bokvist, K., Renstrom, E., Rorsman, P. & Smith, P.A. (1996) Endocytosis of secretory granules in mouse pancreatic beta-cells evoked by transient elevation of cytosolic calcium. *Journal of Physiology*, **493 Pt 3**, 755-767.

Emptage, N., Bliss, T.V.P. & Fine, A. (1999) Siglees synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. *Neuron*, **22**, 115-124.

Emptage, N., Reid, C.A. & Fine, A. (2001) Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca²⁺ entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron*, **29**, 197-208.

Fernández de Miguel, F. & Drapeau, P. (1995) Synapse formation and function: insights from identified leech neurons in culture. *Journal of Neurobiology*, **27**, 367-379.

Ferris, C.F. (2000) Adolescent stress and neural plasticity in hamsters: a vasopressin-serotonin model of inappropriate aggressive behaviour. *Experimental Physiology*, **Spec No**, 85S-90S.

Fill, M. & Coronado, R. (1988) Ryanodine receptor channel of sarcoplasmic reticulum. *Trends in Neuroscience*, **11**, 453-457.

Frazer, A. & Hensler, J.G. (1994) Serotonin. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (ed. by G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers and P.B. Molinoff), p.283-308. Raven Pres, New York.

- Fried, G., Terenius, L., Hökfelt, T. & Goldstein, M. (1985) Evidence for differential localization of noradrenaline and neuropeptide Y in neuronal storage vesicles isolated from rat vas deferens. *Journal of Neuroscience*, **5**, 450-458.
- Friesen, W.O., Poon, M. & Stent, G.S. (1976) An oscillatory neuronal circuit generating a locomotory rhythm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **73**, 3734-3738.
- Fuchs, P.A., Henderson, L. & Nicholls, J.G. (1982) Chemical transmission between individual Retzius and sensory neurones of the leech in culture. *Journal of Physiology (London)*, **323**, 195-210.
- Fuchs, P.A., Nicholls, J.G. & Ready, D.F. (1981) Membrane properties and selective connections of identified leech neurones in culture. *Journal of Physiology (London)*, **316**, 203-223.
- Fuxe, K., Li, X.M., Bjelke, B., Hedlund, P.B., Biagini, G. & Agnati, L.F. (1994) Possible mechanisms for the powerful actions of neuropeptides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **739**, 42-59.
- Gillis, M.A. & Anctil, M. (2001) Monoamine release by neurons of a primitive nervous system: an amperometric study. *Journal of Neurochemistry*, **76**, 1774-1784.
- Gillis, K.D. (1995) Techniques for membrane capacitance measurements. *Single-Channel Recording* (ed. by B. Sakmann and E. Neher), p.155-197. Plenum Press, New York.
- Giovannucci, D.R., Yule, D.I. & Stuenkel, E.L. (1998) Optical measurement of stimulus-evoked membrane dynamics in single pancreatic acinar cells. *American Journal of Physiology*, **275**, C732-739.
- Goldburt, V., Sabban, B.A. & Kleinhaus, A.L. (1994) Serotonin depletion inhibits feeding in carnivorous leeches (*Haemopsis*). *Behavioral and Neural Biology*, **61**, 47-53.
- Golding, D. & Bayraktaroglu, E. (1984) Exocytosis of secretory granules. A probable mechanism for the release of neuromodulators in invertebrates neuropil. *Experientia*, **40**, 1277-1280.
- Goy, M.F. & Kravitz, E.A. (1989) Cyclic AMP only partially mediates the actions of serotonin at lobster neuromuscular junctions. *Journal of Neuroscience*, **9**, 369-679.
- Graeff, F.G., Guimaraes, F.S., De Andrade, T.G. & Deakin, J.F. (1996) Role of 5-HT in stress,

anxiety, and depression. *Pharmacological and Biochemical Behavior*, **54**, 129-141.

Groome, J.R., Clark, M. & Lent, C.M. (1993) The behavioural state of satiation in the leech is regulated by body distension and mimicked by serotonin depletion. *Journal of Experimental Biology*, **182**, 265-270.

Gross, C., Santarelli, L., Brunner, D., Zhuang, X. & Hen, R. (2000) Altered fear circuits in 5-HT(1A) receptor KO mice. *Biological Psychiatry*, **48**, 1157-1163.

Gu, X. (1991) Effect of conduction block at axon bifurcations on synaptic transmission to different postsynaptic neurones in the leech. *J. Physiol (London)*, **441**, 755-778.

Guo, X., Przywara, D.A., Wakade, T.D. & Wakade, A.R. (1996) Exocytosis coupled to mobilization of intracellular calcium by muscarine and caffeine in rat chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*, **67**, 155-162.

Hagiwara, S. & Morita, H. (1962) Electrotonic transmission between two nerve cells in the leech ganglion. *Journal of Neurophysiology*, **25**, 721-731.

Harris-Warrick, R.M. & Kravitz, E.A. (1984) Cellular mechanisms for modulation of posture by octopamine and serotonin in the lobster. *Journal of Neuroscience*, **4**, 1976-1993.

Heinemann, C., von Rüden, L., Chow, R.H. & Neher, E. (1993) A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflügers Archive*, **424**, 105-112.

Henderson, L. (1983) The role of 5-hydroxytryptamine as a transmitter between identified leech neurones in culture. *Journal of Physiology (London)*, **339**, 311-326.

Henderson L. P., Kuffler D. P., Nicholls J. G. & Zhang, R. (1983) Structural and functional analysis of synaptic transmission between identified leech neurones in culture. *Journal of Physiology (London)*, **340**, 347-358.

Higley, J.D. & Linnoila, M. (1997) Low central nervous system serotonergic activity is traitlike and correlates with impulsive behavior. A nonhuman primate model investigating genetic and environmental influences on neurotransmission. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **836**, 39-56.

Hillsley, K., Kenyon, J.L. & Smith, T.K. (2000) Ryanodine-sensitive stores regulate the excitability of AH neurons in the myenteric plexus of guinea-pig ileum. *Journal of Neurophysiology*, **84**,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2777-2785.

Hökfelt, T. (1991) Neuropeptides in perspective: the last then years. *Neuron*, **7**, 867-879.

Huang, L.-Y.M. & Neher, E. (1996) Ca²⁺-dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons. *Neuron*, **17**, 135-145.

Hul, I.E.M., Lorrain, D.S., Du, J., Matuszewich, L., Lumley, L.A., Putnam, S.K. & Moses, J. (1999) Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behavioral Brain Research*, **105**, 105-116.

Jacobs B. L. & Azmitia, E.C. (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, **72**, 165-229.

Jacobs, B.L. & Fornal, C.A. (1993) 5-HT and motor control: a hypothesis. **16**, 346-352.

Jaffe, E.H., Marty, A., Schulte, A. & Chow, R.H. (1998) Extrasynaptic vesicular transmitter release from the somata of substantia nigra neurons in rat midbrain slices. *Journal of Neuroscience*, **18**, 3548-3553.

Jahnsen, J.K.S. & Nicholls, J.G. (1972) Regeneration and changes in synaptic connections between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **69**, 636-639.

Jenike, M.A., Rauch, S.L., Cummings, J.L., Savage, C.R. & Goodman, W.K. (1996) Recent developments in neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, **57**, 492-503.

Jensen, K. & Mody, I. (2001) L-type Ca²⁺ channel-mediated short-term plasticity of GABAergic synapses. *Nature Neuroscience*, **4**, 975-976.

Jobe, P.C., Dailey, J.W. & Wernicke, J.F. (1999) A noradrenergic and serotonergic hypothesis of the linkage between epilepsy and affective disorders. *Critical Reviews in Neurobiology*, **13**, 317-356.

Jobling, P., McLachlan, E.M. & Sah, P. (1993) Calcium induced calcium release is involved in the afterhyperpolarization in one class of guinea pig sympathetic neurone. *Journal of Autonomus Nervous System*, **42**, 251-257.

Johansen, J. & Kleinhaus, A.L. (1986) Differential sensitivity of tetrodotoxin of nociceptive

neurons in 4 species of leeches. *Journal of Neuroscience*, **6**, 3499-3504.

Kang, G. & Holz, G.G. (2003) Amplification of exocytosis by Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in INS-1 pancreatic beta cells. *Journal of Physiology*, **546**, 175-189.

Kano, M., Garaschuk, O., Verkhratsky, A. & Konnerth, A. (1995) Ryanodine receptor-mediated intracellular calcium release in rat cerebellar Purkinje neurones. *Journal of Physiology (London)*, **487**, 1-16.

Kasai, H., Takagi, H., Ninomiya, Y., Kishimoto, T., Ito, K., Yoshida, A., Yoshioka, T. & Miyashita, Y. (1996) Two components of exocytosis and endocytosis in phaeochromocytoma cells studied using caged Ca²⁺ compounds. *Journal of Physiology (London)*, **494**, 53-65.

Katz, B. & Miledi, R. (1967a) The release of acetylcholine from nerve endings by graded electric pulses. *Proceedings of the Royal Society B*, **167**, 23-38.

Katz, B. & Miledi, R. (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *Journal of Physiology*, **195**, 481-492.

Katz, B. & Miledi, R. (1967b) A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *Journal of Physiology*, **192**, 407-436.

Kilic, G. (2002) Exocytosis in bovine chromaffin cells: studies with patch-clamp capacitance and FM1-43 fluorescence. *Biophysical Journal*, **83**, 849-857.

Kilic, G., Angleson, J.K., Cochilla, A.J., Nussinovitch, I. & Betz, W.J. (2001) Sustained stimulation of exocytosis triggers continuous membrane retrieval in rat pituitary somatotrophs. *Journal of Physiology*, **532**, 771-783.

Klein, M., Shapiro, E. & Kandel, E.R. (1980) Synaptic plasticity and the modulation of the Ca²⁺ current. *Journal of Experimental Biology*, **89**, 117-157.

Kravitz, E.A. (1988) Hormonal control of behavior: Amines and the biasing of behavioral output in lobsters. *Science*, **241**, 1775-1781.

Kravitz, E.A. (2000) Serotonin and aggression: insights gained from a lobster model system and speculations on the role of amine neurons in a complex behavior. *Journal of Comparative Physiology [A]*, **186**, 221-238.

Kristan, W.B. & Nusbaum, M.P.Jr. (1983) The dual role of serotonin in leech swimming. *Journal*

of Physiology (Paris), **78**, 743-747.

Kuffler, D.P., Nicholls, J.G. & Drapeau, P. (1987) Transmitter localization and vesicle turnover at a serotonergic synapse between identified leech neurons in culture. *Journal of Comparative Neurology*, **256**, 516-526.

Kuffler, S.W. & Nicholls, J.G. (1966) The physiology of neuroglial cells. *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol.*, **57**, 1-90.

Kuffler, S.W. & Potter, E. (1964) Glia in the leech nervous system: Physiological properties and neuron-glia relationships. *Journal of Neurophysiology*, **27**, 290-320.

Lancaster B. & Zucker, R.S. (1994) Photolytic manipulation of Ca²⁺ and the time course of slow, Ca²⁺-activated K⁺ current in rat hippocampal neurones. *Journal of Physiology*, **475**, 229-239.

Lattanzio, F., Schlatterer, F.R., Nicar, M., Campbel, I.K. & Sutko, J. (1987) The effects of ryanodine on passive calcium fluxes across sarcoplasmic reticulum membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 2711-2718.

Leenders, A.G.M., Scholten, G., Wiegant, V.M., Lopes Da Silva, F.H. & Ghijsen, W.E.J.M. (1999) Activity-dependent neurotransmitter release kinetics: correlation with changes in morphological distributions of small and large vesicles in central nerve terminals. *European Journal of Neuroscience*, **11**, 4269-4277.

Lemmens, R., Larsson, O., Berggren, P.O. & Islam, M.S. (2001) Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum amplifies the Ca²⁺ signal mediated by activation of voltage-gated L-type Ca²⁺ channels in pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 9971-9977.

Lent, C.M. (1973) Retzius Cells: neuroeffectors controlling mucus release by the leech. *Science*, **179**, 693-696.

Lent, C.M. (1985) Serotonergic modulation of the feeding behavior of the medicinal leech. *Brain Research Bulletin*, **14**, 643-655.

Lent, C.M. & Dickinson, M.H. (1984) Serotonin integrates the feeding behavior of the medicinal leech. *Journal of Comparative Physiology A*, **154**, 457-471.

Lent, C.M. & Frazer, B.M. (1977) Connectivity of the monoamine-containing neurones in central nervous system of leech. *Nature*, **266**, 844-847.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Lesch, K.P. & Merschedorf, U. (2000) Impulsivity, aggression, and serotonin: a molecular psychobiological perspective. *Behavioral Science and Laws*, **18**, 581-604.
- Lessman, V. & Dietzel, I.D. (1995) Two kinetically distinct 5-Hydroxytryptamine-activated Cl-conductances at Retzius P-cell synapses of the medicinal leech. *Journal of Neuroscience*, **15**, 1496-1505.
- Lessmann, V. & Dietzel, I.D. (1991) Development of serotonin-induced ion currents in identified embryonic Retzius cells from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*). *Journal of Neuroscience*, **11**, 800-809.
- Lewis, J.E. & Kristan, W.B.Jr. (1998) A neuronal network for computing population vectors in the leech. *Nature*, **391**, 76-79.
- Liu, Y. & Nicholls J. (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 B*, **236**, 253-268.
- Livingstone, M.S., Harris-Warrick, R.M. & Kravitz, E.A. (1980) Serotonin and octopamine produce opposite postures in lobsters. *Science*, **208**, 76-79.
- Llano, I., Dressen, J., Kano, M. & Konnerth, A. (1991) Intradendritic release of calcium induced by glutamate in cerebellar Purkinje cells. *Neuron*, **7**, 577-583.
- Llano, I., González, J., Caputo, C., Lai, F.A., Blayney, L.M., Tan, Y.P. & Marty, A. (2000) Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nature Neuroscience*, **3**, 1256-1265.
- Lockery, S.R. & Kristan, W.B.Jr. (1991) Two forms of sensitization of the local bending reflex of the medicinal leech. *Journal of Comparative Physiology [A]*, **168**, 165-177.
- Lukyanetz, E.A. & Neher, E. (1999) Different types of Ca²⁺ channels and secretion from bovine chromaffin cells. *European Journal of Neuroscience*, **11**, 2865-2873.
- Lundberg, F.M. & Hökfelt, T. (1983) Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. *Trends in Neuroscience*, **6**, 325-333.
- Lundberg, J.M., Fried, G., Fahrenkrug, J., Holmsedt, B., Hökfelt, T., Lagercrantz, H., Lundgren, G. & Anggard, A. (1981) Subcellular fractionation of cat submandibular gland: comparative studies

on the distribution of acetylcholine and vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Neuroscience*, **6**, 1001-1010.

Lundberg, J.M., Rudehill, A., Sollevi, A., Fried, G. & Wallinc G. (1989) Co-release of neuropeptide Y and noradrenaline from pig spleen in vivo: importance of subcellular storage, nerve impulse frequency and pattern, feedback regulation and resupply by axonal transport. *Neuroscience*, **28**, 475-486.

Lundberg, J.M., Rudehill, A., Sollevi, A., Theodorsson-Norheim, E. & Hamberger, B. (1986) Frequency and reserpine-dependent chemical coding of sympathetic transmission: differential release of noradrenaline and neuropeptide Y from pig spleen. *Neuroscience Letters*, **63**,

Ma, r.A. & Drapeau, P. (1996) Modulation of conduction block in leech mechanosensory neurons. *Journal of Neuroscience*, **16**, 4335-4343.

Mangan, P.S., Curran, G.A., Hurney, C.A. & Friesen, W.O. (1994) Modulation of swimming behavior in the medicinal leech III. Control of cellular properties in motor neurons by serotonin. *Journal of Comparative Physiology A*, **175**, 709-722.

Mansvelder, H.D.y.K.K.S. (2000) Regulation of exocytosis in neuroendocrine cells: spatial organization of channels and vesicles, stimulus-secretion coupling, Ca²⁺ buffers and modulation. *Progress in Neurobiology*, **62**, 427-441.

McAdoo, D.J. & Coggeshall, R.E. (1976) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of biogenic amines in identified neurons and tissues of *Hirudo Medicinalis*. *Journal of Neurochemistry*, **26**, 163-167.

McCall, R.B. & Aghajanian, G.K. (1979) Serotonergic facilitation of facial motoneuron excitation. *Brain Research*, **169**, 11-27.

McPherson, P.S., Kim, Y., Valdivia, H., Knudson, C.M., Takekura, H., Franzini-Armstrong, C., Coronado R. & Campbell, K.P. (1991) The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron*, **7**, 17-25.

Meissner, G. (1986) Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, **261**, 6300-6306.

Meyer, A.C., Neher, E. & Schneggenburger, R. (2001) Estimation of quantal size and number of

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

functional active zones at the calyx of Held synapse by nonstationary EPSC variance analysis. *Journal of Neuroscience*, **21**, 7889-7900.

Moukhlès, H., Bosler, O., Bolam, J.P., Vallee, A., Umbriaco, D., Geffard, M. & Doucet, G. (1997) Quantitative and morphometric data indicate precise cellular interactions between serotonin terminals and postsynaptic targets in rat substantia nigra. *Neuroscience*, **76**, 1159-1171.

Muller, K.J., Nicholls, J.G. & Stent, G.S.e. (1981) *Neurobiology of the leech*, Cold Spring Harbor Publications, Cold Spring Harbor, New York .

Murakami, N., Ishibashi, H., Katsurabayashi, S. & Akaike, N. (2002) Calcium channel subtypes on single GABAergic presynaptic terminal projecting to rat hippocampal neurons. *Brain Research*, **951**, 121-129.

Neher, E. & Marty, A. (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **79**, 6712-6716.

Nicholls, J.G. (1987) *The search for connections: study of regeneration in the nervous system of the leech*. Anonymous Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Nicholls, J.G. & Baylor, D.A. (1968) Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in the CNS of the leech. *Journal of Neurophysiology*, **31**, 740-756.

Nicholls, J.G. & Kuffler, D.P. (1990) Quantal release of serotonin from presynaptic nerve terminals. *Neurochemistry International*, **17**, 157-163.

Nowycky, M.C., Fox, A.P. & Tsien, R.W. (1985a) Long-opening mode of gating of neuronal calcium channels and its promotion by the dihydropyridine calcium agonist Bay K 8644. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **82**, 2178-2182.

Nusbaum, M.P. (1986) Synaptic basis of swim initiation in the leech. III. Synaptic effects of serotonin-containing interneurons (cells 21 and 61) on swim CPG neurons (cells 18 and 208). *Journal of Experimental Biology*, **122**, 303-321.

Nusbaum, M.P. & Kristan, W.B.J. (1986) Swim initiation in the leech by serotonin-containing interneurons cells 21 and 61. *Journal of Experimental Biology*, **122**, 277-302.

Palfrey, H.C. & Artalejo, C.R. (1998) Vesicle recycling revisited: rapid endocytosis may be the first

step. *Neuroscience*, **83**, 969-989.

Payton, B. (1981a) "History of medicinal leeching and early medical references". *Neurobiology of the leech*. (ed. by K.J.N.J.G.y.S.G.S. Muller), p.27-36. Cold Spring Harbor Publications., Cold Spring Harbor, New York.

Payton, B. (1981b) "Structure of the leech nervous system". *Neurobiology of the leech*. (ed. by K.J. Muller, J.G. Nicholls and G.S. Stent), p.35-50. Cold Spring Harbor Publications. Cold Spring Harbor, New York.

Penner, R. & Neher, E. (1988) The role of calcium in stimulus-secretion coupling in excitable and non-excitabile cells. *Journal of Experimental Biology*, **139**, 329-345.

Peters, A., Palay, S.L. & Webster, H. (1991) *The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells*, Oxford University Press, Oxford, U.K.

Pinato, G. & Torre, V. (2000) Coding adaptation during mechanical stimulation in the leech nervous system. *Journal of Physiology*, **529**, 747-767.

Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P. & Meldolesi, J. (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews*, **74**, 595-636.

Prosser, R.A., Miller, J.D. & Heller, C.A. (1990) A serotonin agonist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Research*, **534**, 336-339.

Puopolo, M., Hochstetler, S.E., Gustincich, S., Wightman, R.M. & Raviola, E. (2001) Extrasynaptic release of dopamine in a retinal neuron: activity dependence and transmitter modulation. *Neuron*, **30**, 211-225.

Qian, W.-J. & Kennedy, R.T. (2001) Spatial Organization of Ca Entry and Exocytosis in Mouse Pancreatic β -Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **286**, 315-321.

Raleigh, M.J., McGuire, M.T., Brammer, G.L., Pollack, D.B. & Yuwiler, A. (1991) Serotonergic mechanisms promote dominance acquisition in adult male vervet monkeys. *Brain Research*, **559**, 181-190.

Rall, W. (1969) Time constants and electrotonic length of membrane cylinders and neurons. *Biophysical Journal*, **9**, 1483-1508.

Rapport, M.M., Green, A.A. & Page, I.H. (1948) Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation

- and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, **176**, 1243-1251.
- Ready, D.F. & Nicholls, J. (1979) Identified neurones isolated from leech CNS make selective connections in culture. *Nature*, **281**, 67-69.
- Reuter, H. (1996) Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, **6**, 331-337.
- Rousseau, E. & Meissner, G. (1989) Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel: activation by caffeine. *American Journal of Physiology*, **256**, H328-333.
- Sah, P. & McLachlan, E.M. (1997) Ca²⁺-activated K⁺ currents underlying the afterhyperpolarization in Guinea pig vagal neurons: A role for Ca²⁺-activated Ca²⁺ release. *Neuron*, **7**, 257-264.
- Sahley, C.L. (1994) Serotonin depletion impairs but does not eliminate classical conditioning in the leech *Hirudo medicinalis*. *Behavioral Neuroscience*, **108**, 1043-1052.
- Saller, C.F. & Stricker, E.M. (1976) Hyperphagia and increased growth in rats after intraventricular injection of 5,7-dihydroxytryptamine. *Science*, **192**, 385-387.
- Sanchez-Armass, S., Merz, D.C. & Drapeau, P. (1991) Distinct receptors, second messengers and conductances underlying the dual responses to serotonin in an identified leech neurone. *Journal of Experimental Biology*, **155**, 531-547.
- Satterlie, R.A. & Norekian, T.P. (1996) Modulation of swimming speed in the pteropod mollusc, *Clione limacina*: role of a compartmental serotonergic system. *Invertebrate Neuroscience*, **2**, 157-165.
- Sawada, M. & Coggeshall, R.E. (1976b) A central inhibitory action of 5-hydroxytryptamine in the leech. *Journal of Neurobiology*, **7**, 477-482.
- Sawada, M. & Coggeshall, R.E. (1976a) Ionic mechanism of 5-hydroxytryptamine induced hyperpolarization and inhibitory junctional potential in body wall muscle cells of *Hirudo medicinalis*. *Journal of Neurobiology*, **7**, 63-73.
- Schmitz, Y. & Witkovsky, P. (1997) Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Neuroscience*, **78**, 1209-1216.
- Schneggenburger, R., Meyer, A.C. & Neher, E. (1999) Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron*, **23**, 399-409.

Sheng, Z.H., Westenbroek, R.E. & Catterall, W.A. (1998) Physical link and functional coupling of presynaptic calcium channels and the synaptic vesicle docking/fusion machinery. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **30**, 335-345.

Sitsapesan, R. & Williams, A.J. (1990) Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *Journal of Physiology*, **423**, 425-439.

Smith, S.J., Augustine, G.J. & Charlton, M.P. (1985) Transmission at voltage-clamped giant synapse of the squid: Evidence for cooperativity of presynaptic calcium action. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, **82**, 622-625.

Smith, A.B. & Cunane, T.C. (1996) Ryanodine-sensitive calcium stores involved in neurotransmitter release from sympathetic nerve terminals of the guinea-pig. *Journal of Physiology*, **497**, 657-664.

Smith, C.B. & Betz, W.J. (1996) Simultaneous independent measurement of endocytosis and exocytosis. *Nature*, **380**, 531-534.

Somogyi, G.T., Zernova, G.V., Tanowitz, M. & de Groat, W.C. (1997) Role of L- and N-type Ca²⁺ channels in muscarinic receptor-mediated facilitation of ACh and noradrenaline release in the rat urinary bladder. *Journal of Physiology*, **499 (Pt 3)**, 645-654.

Stewart, R.R., Adams, W.B. & Nicholls, J.G. (1989) Presynaptic calcium currents and facilitation of serotonin release at synapses between cultured leech neurones. *Journal of Experimental Biology*, **144**, 1-12.

Steyer, J.A. & Almers, W. (1999) Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, **76**, 2262-2271.

Sun, M.K., Nelson, T.J. & Alkon, D.L. (2000) Functional switching of GABAergic synapses by ryanodine receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**, 12300-12305.

Szczupak, L. & Kristan, W.B.Jr. (1995) Widespread mechanosensory activation of the serotonergic system of the medicinal leech. *Journal of Neurophysiology*, **74**, 2614-2624.

Teng, H., Cole, J.C., Roberts, R.L. & Wilkinson, R.S. (1999) Endocytic active zones: hot spots for endocytosis in vertebrate neuromuscular terminals. *Journal of Neuroscience*, **19**, 4855-4866.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Thomas, P., Surprenant, A. & Almers, W. (1990) Cytosolic Ca²⁺, exocytosis, and endocytosis in single melanotrophs of the rat pituitary. *Neuron*, **5**, 723-733.
- Torres, G.E., Arfken, C.L. & Andrade, R. (1996) 5-Hydroxytryptamine₄ receptors reduce afterhyperpolarization in hippocampus by inhibiting calcium-induced calcium release. *Molecular Pharmacology*, **50**, 1316-1322.
- Trueta, C., Mendez, B. & De-Miguel, F.F. (2003) Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurones. *Journal of Physiology (London)*, **547**, 405-416.
- Tse, F.W. & Tse, A. (1999) Regulation of exocytosis via release of Ca²⁺ from intracellular stores. *BioEssays*, **21**, 861-865.
- Tse, F.W., Tse, A., Hille, B., Horstmann, H. & Almers, W. (1997) Local Ca²⁺ release from internal stores controls exocytosis in pituitary gonadotrophs. *Neuron*, **18**, 121-132.
- Usachev, Y.M., Shmigol, A., Pronchuk, N., Kostyuk, P. & Verkhatsky, A. (1993) Caffeine-induced calcium release from internal stores in cultured rat sensory neurons. *Neuroscience*, **57**, 845-859.
- Velazquez-Ulloa, N., Blackshaw, S.E., Szczupak, L., Trueta, C., Garcia, E. & De-Miguel, F.F. (2003) Convergence of mechanosensory inputs onto neuromodulatory serotonergic neurons in the leech. *Journal of Neurobiology*, **54**, 604-617.
- Villalobos, C., Nuñez, L. & García-Sancho, J. (1997) Mechanisms for stimulation of rat anterior pituitary cells by arginine and other amino acids. *Journal of Physiology*, **502**, 421-431.
- Von Gersdorff, H. & Matthews, G. (1994) Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature*, **367**, 735-739.
- Wang, L.Y. & Kaczmarek, L.K. (1998) High-frequency firing helps replenish the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Nature*, **394**, 384-388.
- Weiger, W.A. (1997) Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **72**, 61-95.
- Weis, S., Schneggenburger, R. & Neher, E. (1999) Properties of a model of Ca²⁺-dependent vesicle pool dynamics and short term synaptic depression. *Biophysical Journal*, **77**, 2418-2429.

Weisblat, D.A. (1981) "Development of the nervous system". Neurobiology of the leech (ed. by K.J. Muller, J.G. Nicholls and G.S. Stent), p.173-196. Cold Spring Harbor Publications, Cold Spring Harbor, New York.

Whim, M.D. & Lloyd, P.E. (1989) Frequency-dependent release of peptide cotransmitters from identified cholinergic motor neurons in Aplysia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **86**, 9034-9048.

White, S.R., Fung, S.J., Jackson, D.A. & Imel, K.M. (1996) Serotonin, norepinephrine and associated neuropeptides: effects on somatic motoneuron excitability. Progress in Brain Research , **107**, 183-199.

Wiersma, C.A.G. & Ikeda, K. (1964) Comparative Biochemical Physiology, **12**, 509-515.

Willard, A.L. (1981) Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech. Journal of Neuroscience, **1**, 936-944.

Wilson, R.J., Kristan, W.B.Jr. & Kleinhaus, A.L. (1996) An increase in activity of serotonergic Retzius neurones may not be necessary for the consummatory phase of feeding in the leech *Hirudo medicinalis*. Journal of Experimental Biology , **199 (Pt 6)**, 1405-1414.

Wilson, R.J., Skierczynski, B.A., Meye, r.J.K., Skalak, R. & Kristan, W.B.Jr. (1996b) Mapping motor neurone activity to overt behavior in the leech I. Passive biomechanical properties of the body wall. Journal of Comparative Physiology [A], **178**, 637-654.

Wittenberg, G., Loe, r.C.M., Adamo, S.A. & Kristan, W.B.Jr. (1990) Segmental specialization of neuronal connectivity in the leech. Journal of Comparative Physiology, **167**, 453-459.

Wu, L.G., Westenbroek, R.E., Borst, J.G., Catterall, W.A. & Sakmann, B. (1999) Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. Journal of Neuroscience, **19**, 726-736.

Yaksta-Sauerland, B.A. & Coggeshall, R.E. (1973) Neuromuscular junctions in the leech. Journal of Comparative Neurology, **151**, 85-99.

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

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Zaidi, Z.F. & Matthews, M.R. (1999) Stimulant-induced exocytosis from neuronal somata, dendrites, and newly formed synaptic nerve terminals in chronically decentralized sympathetic ganglia of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, **415**, 121-143.

Zangrossi, H.Jr., Viana, M.B., Zanoveli, J., Bueno, C., Nogueira, R.L. & Graeff, F.G. (2001) Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neuroscience Biobehaviour Reviews*, **25**, 637-645.

Zhang, X., Wilson, R.J., Li, Y. & Kleinhaus, A.L. (2000) Chemical and thermal stimuli have short-lived effects on the retzius cell in the medicinal leech. *Journal of Neurobiology*, **43**, 304-311.

Zhang, X., Wilson, R.J., Li, Y. & Kleinhaus, A.L. (2000) Chemical and thermal stimuli have short-lived effects on the retzius cell in the medicinal leech. *Journal of Neurobiology*, **43**, 304-311.

Zorec, R., Sikdar, S.K. & Mason, W.T. (1991) Increased cytosolic calcium stimulates exocytosis in bovine lactotrophs. Direct evidence from changes in membrane capacitance. *Journal of General Physiology*, **97**, 473-497.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN