



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Autoinhibición en neuronas serotoninérgicas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MONTSERRAT GUERRERO CERCÓS

TUTORA: DRA. CITLALI TRUETA SEGOVIA

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi mamá, yaya, hermana, tia Xata,
tio Ramón, Ricardo y Auri.

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	4
- <u>Regulación de funciones fisiológicas por la serotonina</u>	19
- <u>Receptores de serotonina</u>	13
-Autorreceptores	17
- <u>Sistema nervioso de la sanguijuela</u>	20
-Sistema serotoninérgico en sanguijuelas	23
-Sinapsis Retzius – P	25
-Receptores serotoninérgicos en sanguijuela	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
- <u>Aislamiento y cultivo neuronal</u>	30
- <u>Registro intracelular</u>	33
- <u>Estimaciones de cambios en la resistencia membranal</u>	34
- <u>Aplicación de serotonina por iontoforésis</u>	34
- <u>Soluciones y tratamientos farmacológicos</u>	35
- <u>Determinaciones de cambios en la excitabilidad neuronal</u>	36
- <u>Análisis de la liberación sináptica de serotonina</u>	36
- <u>Análisis estadístico</u>	38
RESULTADOS	39
- <u>Respuesta de las neuronas de Retzius después de la estimulación</u>	39
- <u>Determinación de la respuesta de las neuronas de Retzius a la serotonina</u>	42
- <u>La respuesta post-estimulación es producida por la serotonina liberada por las neuronas de Retzius</u>	44
- <u>Efecto de la serotonina en la resistencia de entrada</u>	49
- <u>Relación entre la frecuencia de estimulación y la excitabilidad en neuronas de Retzius</u>	51
- <u>La reducción de la excitabilidad de las neuronas de Retzius se debe a la liberación de serotonina</u>	53
- <u>Autorregulación de la liberación de serotonina en las terminales sinápticas</u> ...	61
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	75
REFERENCIAS	76

RESUMEN

En este trabajo estudiamos el efecto que produce la serotonina sobre la excitabilidad de las propias neuronas serotoninérgicas en el momento de ser liberada y sobre su propia liberación en las terminales sinápticas. Para ello utilizamos neuronas serotoninérgicas de Retzius, aisladas del sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*.

La estimulación de las neuronas de Retzius con trenes de impulsos a diferentes frecuencias en condiciones fisiológicas produjo una hiperpolarización post-potencial que, al igual que las respuestas de las neuronas de Retzius a la serotonina, se invirtió al invertir el gradiente transmembranal de cloro mediante la utilización de microelectrodos intracelulares llenos de cloruro de potasio (KCl). La respuesta post-estimulación se abolió reversiblemente cuando la secreción de serotonina fue bloqueada sustituyendo el calcio por magnesio en la solución extracelular, y no se presentó en neuronas donde la reserva de serotonina fue eliminada mediante el tratamiento con reserpina, mostrando que la respuesta post-estimulación es producida por la serotonina liberada por las propias neuronas de Retzius, que actúa sobre autorreceptores produciendo una hiperpolarización dependiente de corrientes de cloro.

Para estudiar cómo la auto-respuesta a la serotonina afecta la excitabilidad de las neuronas de Retzius, analizamos el porcentaje de fallas en los potenciales de acción durante trenes de pulsos intracelulares de corriente a 1, 10 y 30 Hz. Las neuronas mostraron un aumento en el número de fallas proporcional al incremento en la frecuencia de estimulación. Mientras a 1 Hz las neuronas dispararon un potencial de acción en respuesta a cada pulso de corriente, al incrementar la liberación de serotonina mediante la estimulación a 10 y 30 Hz se presentaron un $23\% \pm 6\%$ y un $47\% \pm 2\%$ de fallas respectivamente. Las fallas desaparecieron reversiblemente al agregar el antagonista serotoninérgico metisergida. Las neuronas tratadas con reserpina, presentaron únicamente un $5 \pm 4\%$ de fallas, pero respondieron a la aplicación iontoforética de serotonina que incrementó el porcentaje de fallas a $35 \pm 3\%$.

Para estudiar cómo la disminución en la excitabilidad afecta la liberación de serotonina de las terminales sinápticas, utilizamos sinapsis formadas en cultivo entre neuronas de Retzius y células mecanosensoriales sensibles a presión (P). Cuando la autoinhibición producida por la serotonina produjo fallas en los potenciales de acción en las neuronas presinápticas, la integral de la corriente postsináptica y el índice de liberación fueron significativamente menores que en registros donde incrementamos la amplitud de la corriente intracelular para forzar a la célula presináptica a disparar todos los potenciales de acción y así sobrepasar el mecanismo de autoinhibición. Además, la cinética de caída de las corrientes sinápticas fue significativamente más larga en presencia de la autoinhibición serotoninérgica que cuando ésta fue sobrepasada, lo cual sugiere que la serotonina además de regular la cantidad de serotonina liberada mediante la regulación de la excitabilidad presináptica, acorta el curso temporal de su propia liberación mediante la hiperpolarización rápida de la membrana presináptica después de la estimulación.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La serotonina o 5-hidroxitriptamina, es una indolamina que actúa como mensajero químico dentro y fuera del sistema nervioso tanto de invertebrados como de vertebrados.

La mayor parte de la serotonina en los mamíferos se encuentra en células fuera del cerebro, como las plaquetas, los mastocitos o las células enterocromafines; sin embargo como no puede atravesar la barrera hematoencefálica, toda la serotonina que hay en el cerebro tiene que ser producida allí.

La serotonina se sintetiza a partir de la hidroxilación inicial del triptofano por medio de la enzima hidroxilasa del triptofano, la cual le transfiere un átomo de oxígeno en la posición 5, dando como resultado 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Esta reacción es el paso limitante en la síntesis de serotonina, y para ello la enzima requiere de oxígeno molecular y pteridina reducida como cofactor. Debido a que la concentración de triptofano en el cerebro normalmente no satura a la enzima, la síntesis de serotonina se incrementa con aumentos en la ingesta de triptofano; el nivel de oxígeno en los tejidos también regula la síntesis de serotonina. Posteriormente el 5-hidroxitriptofano es descarboxilado por la enzima descarboxilasa L-amino ácido aromático (AADC) dando como resultado 5-hidroxitriptamina o serotonina (Figura 1).

La degradación de la serotonina es iniciada por la enzima oxidasa de monoaminas, que la convierte en 5-hidroxiindolacetaldehído, el cual puede ser oxidado por una deshidrogenasa de aldehídos dependiente de NAD^+ para formar ácido 5-hidroxi-inolacético, o bien reducido por una reductasa de aldehídos dependiente de NADH para producir 5-hidroxitriptofol. La vía que se lleva a cabo depende de las concentraciones relativas de NAD^+ y NADH en el tejido. En el cerebro, el principal metabolito de la serotonina es el ácido 5-hidroxi-indolacético.

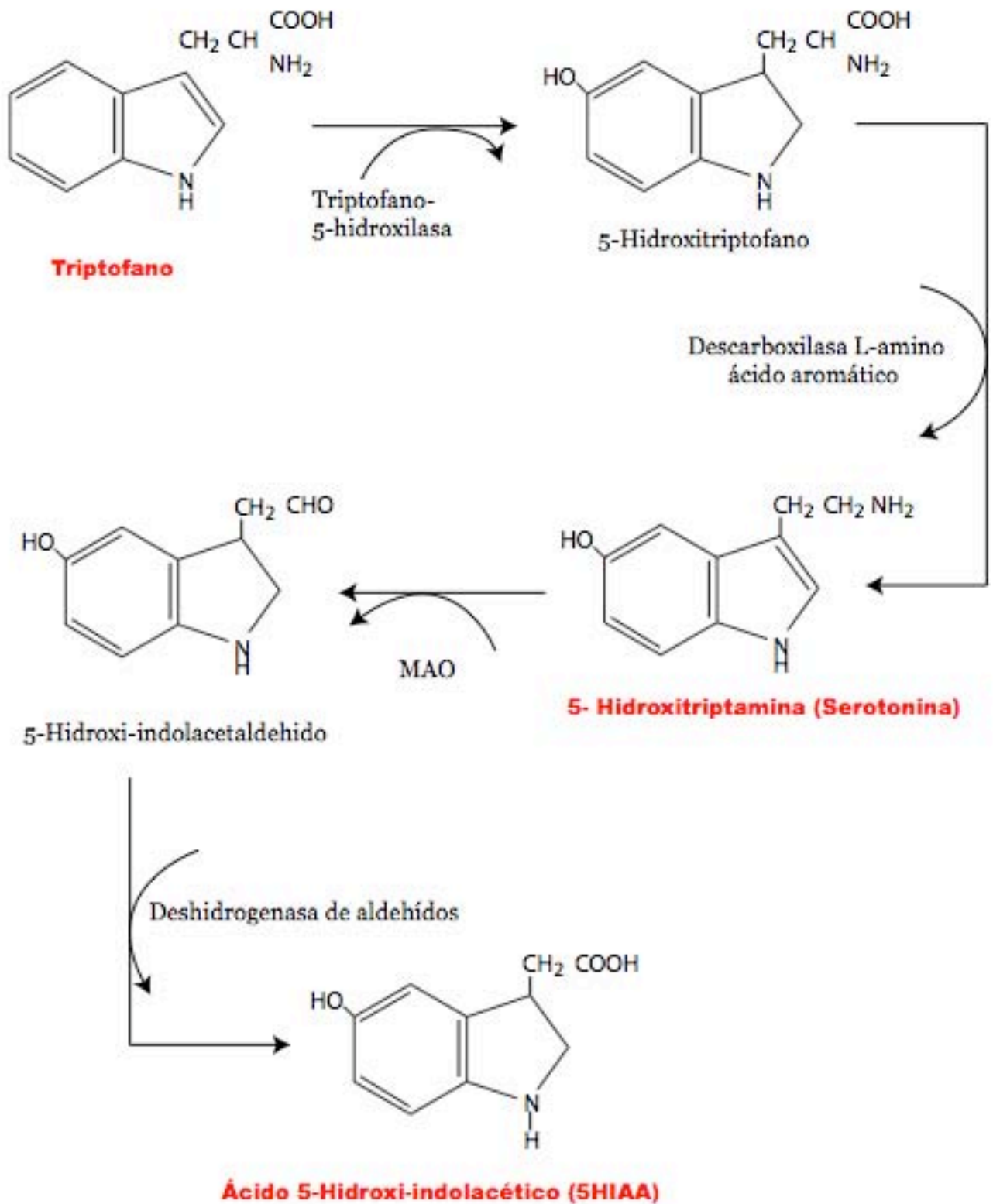


Figura 1. Vía de síntesis, degradación y estructura química de la serotonina (5-Hidroxitriptamina).

Dahlstrom y Fuxe en 1964, usando la técnica de histofluorescencia (Falck-Hillarp, 1962), encontraron la mayoría de los cuerpos serotoninérgicos en grupos celulares designados por Taber, Brodal, y Walberg (1960) como los núcleos del Raphé. Dahlstrom y Fuxe describieron nueve grupos celulares que contienen serotonina, los cuales nombraron B1 a B9. Aunque los somas se encuentran restringidos a éstos núcleos, los axones de las neuronas serotoninérgicas inervan prácticamente todas las áreas del sistema nervioso central (Figura 2).

El número de neuronas serotoninérgicas tanto en vertebrados como en invertebrados es pequeño, comparado con el total de neuronas en el sistema nervioso. Sin embargo las proyecciones de las neuronas serotoninérgicas constituyen uno de los sistemas anatómicos y funcionales más complejos y extensos del cerebro (para revisión ver Jacobs y Azmitia, 1992). Por ejemplo aunque la proporción de neuronas 5-HT respecto al resto de neuronas del SNC es de 1/200,000 su capacidad de inervación de estructuras anteriores, como la corteza cerebral o el hipocampo, es muy alta estimándose de 3 a 6 millones el número de varicosidades por mm^3 (Audet, *et al.*, 1989; Oleskevich y Descarries, 1990). Esto, aunado a la diversidad e importancia de las funciones que regula la serotonina en el sistema nervioso, nos lleva a suponer que la actividad de las neuronas serotoninérgicas debe estar muy finamente regulada.

Los grupos de neuronas serotoninérgicas B1 a B5 son pequeños, están en los núcleos más caudales del Raphé y envían sus proyecciones dentro del tallo cerebral y hacia la médula espinal, donde modulan la transmisión en las vías involucradas en la percepción del dolor. Los grupos B6 y B7 son considerados conjuntamente como el núcleo dorsal de Raphé. El grupo B8 corresponde al núcleo medio del Raphé. El grupo B9 esta formado por parte del tegmento ventrolateral del puente y el cerebro medio.

Los núcleos del Raphé dorsal y medial dan salida a múltiples paquetes de axones que forman caminos separados para diferentes regiones cerebrales, inervando prácticamente todo el cerebro, incluyendo la corteza cerebral.

Se ha observado que estructuras funcionalmente relacionadas en el cerebro son inervadas por el mismo grupo de neuronas serotoninérgicas, por ejemplo el hipocampo y el séptum (estructuras límbicas) parecen estar inervadas predominantemente por neuronas del Raphé medial, mientras que el estriado y la sustancia nigra (sistema de los ganglios basales que median la actividad motora) son inervados por el Raphé dorsal. Además, las células dentro del Raphé dorsal y medial están organizadas en zonas particulares o grupos que envían axones a áreas específicas del cerebro como la corteza o el hipocampo.

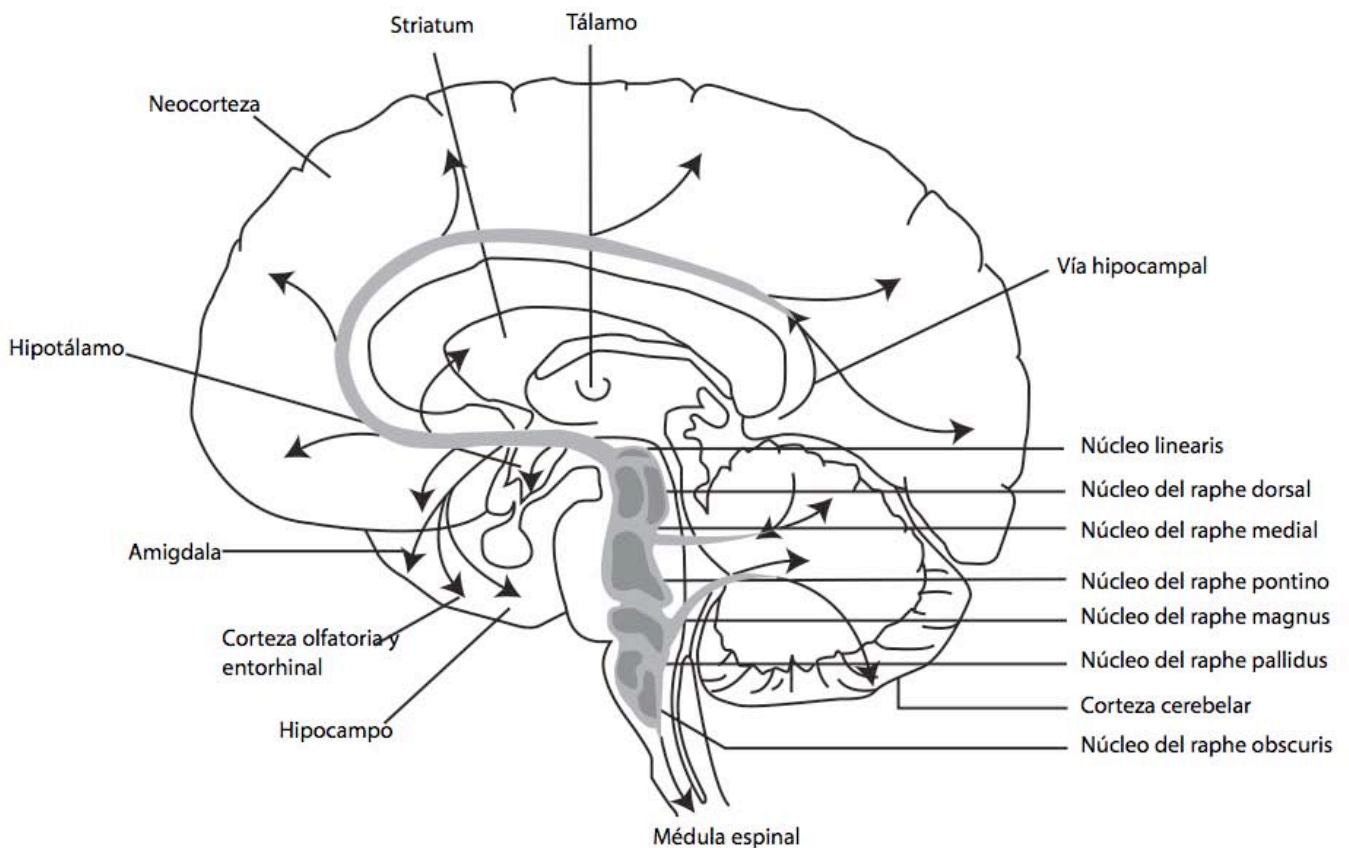


Figura 2.- Núcleos serotoninérgicos y sus principales proyecciones (representadas por flechas) en el SNC. Modificado de Nestler, *et al.*, Molecular Neuropharmacology, 2001.

La liberación de serotonina ocurre principalmente por exocitosis, ya que por ser una molécula con carga eléctrica, no puede atravesar la membrana

plasmática por difusión simple. Además, es necesario que la serotonina se almacene en vesículas para protegerla de la degradación por la oxidasa de monoaminas. La serotonina es almacenada en vesículas por un transportador vesicular de monoaminas sensible a la reserpina y tetrabenacina (Ericsson, *et al.*, 1992). En el interior de la vesícula, la serotonina permanece unida a una proteína denominada *proteína de unión a la serotonina* o SBP por sus siglas en inglés (Gershon, *et al.*, 1983).

Una vez liberada, la serotonina puede activar receptores pre y postsinápticos o ser recaptada mediante su transportador específico, siendo éste el principal mecanismo para regular su concentración extracelular y su disponibilidad para activar receptores. El transportador se localiza en áreas ricas en cuerpos y terminaciones serotoninérgicas (Azmitia, 1981; Fuxe, *et al.*, 1983; Hrdina, *et al.*, 1990; Qian, *et al.*, 1995), así como en células gliales (Katz y Kimelberg, 1985).

Algunas terminales serotoninérgicas establecen contactos sinápticos especializados con neuronas blanco. Estos contactos especializados sugieren una asociación fuerte entre la neurona presináptica y su blanco. Sin embargo en algunas áreas del sistema nervioso central hay sitios en varicosidades axonales y en dendritas que morfológicamente parecen ser de liberación, pero carecen de estructuras postsinápticas (Chazal y Ralston, 1987; Moukhles, *et al.*, 1997). Se ha propuesto que en estos sitios, la serotonina liberada difunde para actuar como neuromodulador, modificando la actividad sináptica en las neuronas circundantes (Bunnin y Wightman, 1999). Además, la serotonina es liberada en grandes cantidades por el soma de las neuronas serotoninérgicas (Trueta, *et al.*, 2003a), como ocurre con otros neuromoduladores (Zaidi y Matthews, 1997, 1999; Puopolo, 2001; Huang y Neher, 1996) lo cual podría tener efectos paracrin. Tanto en vertebrados como en invertebrados, la serotonina es también secretada por órganos neurohemáticos hacia el sistema circulatorio, actuando como neurohormona sobre órganos periféricos. La serotonina entonces, puede actuar de tres modos distintos: como neurotransmisor en sinapsis especializadas, como neuromodulador en sitios de secreción paracrina, y como neurohormona, cuando es liberada a la circulación desde órganos neurosecretorios.

Los mecanismos de liberación de serotonina en terminales sinápticas se conocen a partir de sinapsis entre neuronas cultivadas de sanguijuela, en las que la serotonina se encuentra tanto en vesículas claras como en vesículas de núcleo denso (Kuffler, *et al.*, 1987; Bruns, *et al.*, 2000). En estas terminales sinápticas, la liberación es cuántica, dependiente de calcio (Henderson, *et al.*, 1983) y del potencial de membrana presináptico (Dietzel, *et al.*, 1986).

Regulación de funciones fisiológicas por la serotonina.

La serotonina desempeña un papel muy importante regulando circuitos neuronales que controlan una gran variedad de funciones fisiológicas y conductas tanto en invertebrados como en vertebrados, incluyendo al ser humano. Sin embargo, a diferencia de los invertebrados, en donde se conocen muy bien las vías y los mecanismos por los que la serotonina ejerce sus efectos, la complejidad del sistema nervioso de los vertebrados no ha permitido tener un conocimiento tan profundo de estos mecanismos.

Entre las funciones que regula la serotonina se encuentran algunos patrones motores (McCall y Aghajanian, 1979; Jacobs y Fornal, 1993; White, *et al.*, 1996; Weiger, 1997), la ingestión de alimentos (Breisch, *et al.*, 1976; Saller y Stricker, 1976), el sueño, la atención (Jacobs y Azmitia, 1992), la conducta sexual (Hull, *et al.*, 1999), la conducta social desde la agresión hasta la depresión (Raleigh, *et al.*, 1991) y el aprendizaje (Klein, *et al.*, 1980; Byrne, *et al.*, 1991; Ehrlich, *et al.*, 1992; Sahley, 1994). Además participa en el control hipotalámico de la secreción pituitaria, de prolactina, adrenocorticotropina y hormona del crecimiento (Frazer y Hensler, 1994).

En humanos, se ha asociado a la serotonina con varios desórdenes conductuales y trastornos neurológicos como la depresión (Arango, *et al.*, 2002), la esquizofrenia (Brinden, *et al.*, 2002), la epilepsia (Jobe, *et al.*, 1999), la ansiedad (Jenike, *et al.*, 1996), así como en trastornos alimenticios como la anorexia nerviosa (Frazer y Hensler, 1994).

Se ha propuesto que las vías serotoninérgicas en los mamíferos controlan la ansiedad. La activación de la vía ascendente del núcleo dorsal del Raphé facilita las conductas defensivas aprendidas. Por otro lado, la activación de la vía del núcleo dorsal del Raphé al área periventricular inhibe las reacciones innatas de pelea o escape. Se cree que la disfunción de éstas vías está relacionada con el trastorno de ansiedad y con el pánico (Zangarossi, *et al.*, 2001). La vía del núcleo medial del Raphé hacia el hipocampo, por su parte, atenúa el estrés mediante la facilitación de la transmisión en el hipocampo (Graeff, *et al.*, 1996). Los ratones que no expresan el receptor 5HT1A muestran más miedo en varias pruebas de comportamiento, lo que sugiere que este receptor modula algún circuito relacionado con el miedo (Gross, *et al.*, 2000).

La serotonina parece estar involucrada también en la regulación de los ritmos circadianos, ya que el núcleo supraquiasmático, que es la estructura que coordina estos ciclos, recibe una inervación serotoninérgica muy densa de los núcleos del Raphé. Aunque se desconoce la función exacta de esta entrada serotoninérgica, se ha mostrado que la aplicación de agonistas serotoninérgicos cambia la fase de actividad eléctrica espontánea de las neuronas de núcleo supraquiasmático en rebanadas de cerebro aisladas (Prosser, *et al.*, 1990). En el gato, las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del Raphé tienen cambios marcados en su actividad a lo largo de estos ciclos. Durante la vigilia, tienen una actividad lenta y rítmica, que disminuye cuando el animal entra en estado de sueño de ondas lentas. Durante el sueño REM la actividad en estas neuronas cesa por completo. En contraste, estímulos que producen atención incrementan la actividad de estas neuronas. Se ha propuesto que la serotonina coordina la actividad del sistema nervioso manteniendo un tono de actividad de acuerdo con el nivel de atención del organismo (Jacobs y Azmitia, 1992).

La accesibilidad para realizar registros electrofisiológicos en neuronas identificadas que ofrecen los invertebrados ha permitido estudiar con detalle las funciones de la serotonina y las vías neuronales que regula. En langostas se ha estudiado ampliamente la modulación que ejerce la serotonina en la conducta agresiva y en las conductas asociadas con el establecimiento de jerarquías sociales entre pares de individuos. Cuando se colocan dos langostas conviviendo en un mismo espacio, en un principio ambas muestran una

conducta agresiva que consiste en caminar erguidas manteniendo las extremidades flexionadas y mostrando las pinzas hacia adelante. Los dos individuos presentarán algunos encuentros agresivos, pero posteriormente se determina cuál de ellos va a ser el dominante y cuál el subordinado. Con base en la descripción anterior el individuo que resulta dominante permanece erguido con las extremidades flexionadas y se desplazará por todo el tanque, mientras que el subordinado tiende a extender las extremidades, pegando su cuerpo al fondo y permanece en rincones del tanque, evitando al individuo dominante (Harris-Warrick y Kravitz, 1984; Kravitz, 2000). La serotonina y la octopamina producidas en el sistema nervioso de estos animales regulan las conductas que determinan si un individuo es dominante o subordinado. La inyección de serotonina produce una postura dominante que consiste en la flexión de las extremidades y el abdomen, mientras que la octopamina por el contrario produce una conducta sumisa que consiste en la extensión de las extremidades (Livingstone, *et al.*, 1980). En estos organismos se conoce con detalle el mecanismo 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). La octopamina, por el contrario, inhibe a las motoneuronas excitadoras de los músculos flexores y a las inhibitoras de los músculos extensores, y excita a las motoneuronas activadoras de los músculos extensores y a las inhibitoras de los músculos flexores (Harris-Warrick y Kravitz, 1984).

La serotonina también modula la conducta agresiva y el establecimiento de la dominancia social en los mamíferos, incluyendo al ser humano. En los primates, los individuos con una baja actividad serotoninérgica en el sistema nervioso central (Higley y Linnoila, 1997) o tratados con antagonistas serotoninérgicos (Raleigh, *et al.*, 1991), expresan conductas agresivas e impulsivas que los llevan a un aislamiento social convirtiéndose en

subordinados, mientras que los individuos que fueron tratados con agonistas serotoninérgicos o inhibidores de la recaptura de serotonina muestran menos agresividad, convirtiéndose en dominantes (Raleigh, *et al.*, 1991).

La serotonina inhibe también algunos aspectos del comportamiento sexual, en ratas tanto hembras como machos. En machos se ha visto que incrementa la latencia para la iniciación de la cópula y para la eyaculación (Hull, *et al.*, 1999) .

En los mamíferos el incremento de serotonina o la inyección intraventricular de inhibidores de la recaptura de serotonina disminuyen la ingesta de alimentos. Por el contrario la activación de receptores 5HT1A que inhiben el disparo de las neuronas serotoninérgicas, incrementa la ingesta de alimentos (Breisch, *et al.*, 1976; Saller y Stricker, 1976). En invertebrados como la sanguijuela, la serotonina es un transmisor de particular importancia en todos los aspectos de la conducta alimenticia, como se describe con detalle más adelante.

La serotonina también participa en procesos de aprendizaje. Por ejemplo en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la asociación entre el olor y el alimento es producto de un proceso celular de aprendizaje cuya neurotransmisión está mediada por serotonina. (Sze, *et al.*, 2000; Nuttley, 2002). La ingesta puede reducir la sensibilidad al olor por medio de un mecanismo serotoninérgico en donde la reducción de serotonina disminuye la sensibilidad al olor (Chao, *et al.*, 2004). La serotonina modula también procesos de aprendizaje en la sanguijuela (Ehrlich, *et al.*, 1992; Sahley, 1994; Lockery y Kristan, 1991), modificando la actividad de las células S (Burell, *et al.*, 2001, 2002).

En *Aplysia* la estimulación del manto por tacto o por corrientes de agua produce la retracción del sifón y del manto. Si se aplica un estímulo de intensidad media después de uno muy fuerte como un choque eléctrico a la cola del animal, la intensidad de la respuesta aumenta y permanece así por más de una hora. A este fenómeno se le conoce como sensibilización. Se ha encontrado que la estimulación intensa produce la liberación de serotonina de

interneuronas, la cual actúa sobre las neuronas sensoriales activando la producción de AMPc, que a su vez activa a la cinasa de proteínas A. Ésta fosforila un tipo de canales de potasio llamados canales S. La fosforilación reduce la actividad de estos canales, con lo que la duración del potencial de acción es prolongada y por lo tanto entra más calcio a la terminal presináptica. Además, el AMPc incrementa la movilización de vesículas sinápticas hacia la poza liberable, lo cual incrementa la transmisión a las motoneuronas que producen el reflejo de retracción del manto (Klein, *et al.*, 1980; Byrne, *et al.*, 1991).

Receptores de serotonina.

La serotonina actúa sobre distintos tipos de receptores, que se distinguen por su farmacología y por las respuestas que producen en las células blanco. La mayoría de los receptores a serotonina son metabotrópicos; sólo los receptores 5-HT₃ son ionotrópicos (Peroutka, 1993). Cada uno de los receptores está distribuido de manera distinta en las diferentes áreas del sistema nervioso central. En los mamíferos se han identificado siete tipos de receptores a serotonina, algunos de los cuales tienen a su vez varios subtipos.

Los receptores 5-HT₁ se caracterizan por su alta afinidad por la serotonina y constituyen una población heterogénea en cuanto a su farmacología: el receptor 5-HT_{1A} tiene una alta afinidad por la espiperona (Peroutka y Snyder, 1979), mientras que el 5-HT_{1B} tiene baja afinidad por este fármaco (Pedigo, *et al.*, 1981). Los receptores 5-HT_{1A} tienen una localización dual: se localizan en el cuerpo de las neuronas serotoninérgicas, donde actúan como autorreceptores y también en terminales postsinápticas, preferentemente en estructuras límbicas (Pazos y Palacios, 1985; Verge, *et al.*, 1985; Miquel, *et al.*, 1991; Pompeiano, *et al.*, 1992; Kia, *et al.*, 1996). Los receptores 5-HT_{1A} están presentes en alta densidad en neuronas piramidales y granulares en el hipocampo (Pompeiano, *et al.*, 1992; Burneo, *et al.*, 1995; Francis, *et al.*, 1992), el séptum, la amígdala, el hipotálamo y la neocorteza (Barnes y Sharp, 1999). Tanto en el hipocampo como en el núcleo del Raphé, los receptores 5-HT_{1A} están asociados a la apertura de canales de K⁺, a través de una proteína G

(Nicoll, *et al.*, 1990; Aghajanian, 1995). En tejido hipocampal el receptor 5-HT_{1A} se puede acoplar positivamente con la adenilato ciclasa (Shenker, *et al.*, 1983; Markstein, *et al.*, 1986; Fayolle, *et al.*, 1988), pero además se puede acoplar negativamente con la adenilato ciclasa mediante proteínas G (Boess y Martin, 1994; Saudou y Hen, 1994; Albert, *et al.*, 1996).

Algunas especies como en el cerdo, el gato, los bovinos y el hombre, no presentan el receptor 5-HT_{1B} pero presentan un tipo de receptor llamado 5-HT_{1D}. Por medio de estudios de unión de radioligandos, se ha demostrado que el receptor 5-HT_{1B} en ratas y ratones y el receptor 5-HT_{1D} en cerebro bovino y humano se presentan en alta densidad en los ganglios basales, particularmente en el globo pálido, y la sustancia nigra (Pazos, *et al.*, 1985a; Verge, *et al.*, 1986; Bruinvels, *et al.*, 1993). En el plexo coroideo se encontró una alta densidad de otro grupo de receptores 5-HT₁ con características farmacológicas distintas a los dos anteriores. A este receptor se le llamó 5-HT_{1C}. Los receptores 5-HT_{1B} y 1D son también autorreceptores. Hay receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} en sitios postsinápticos donde pueden modular la liberación de otros neurotransmisores (Maura y Raiteri, 1986; Cassel, *et al.*, 1995; Harel-Dupas, *et al.*, 1991). Estos receptores serotoninérgicos están asociados a la inhibición de adenilato ciclasa a través de una proteína G (Adham, *et al.*, 1992; Levy, *et al.*, 1992; Hamblin y Metcalf, 1991; Weinshank, *et al.*, 1992).

La distribución y función del resto de receptores de tipo 1 (5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}) se conoce mucho menos debido a la falta de radioligandos selectivos. El receptor 5-HT_{1E} se identificó inicialmente en homogenados de corteza humana (Leonhardt, *et al.*, 1989) y tiene una distribución parecida a la de los receptores 5-HT_{1B} (Millar y Teitler, 1992). El ARNm del receptor 5-HT_{1F} se ha encontrado en núcleo del Raphé dorsal, corteza, hipocampo, estriado y, en menor grado, en tálamo e hipotálamo (Adham, *et al.*, 1993; Lovenberg, *et al.*, 1993).

En muchas áreas de la corteza cerebral se encuentra una alta densidad de receptores 5-HT₂. Los receptores 5-HT₂ también se encuentran con una densidad particularmente alta en el claustrum, una región que está conectada a la corteza visual, a partes del sistema límbico, a los ganglios basales y al

núcleo olfatorio (Pazos, *et al.*, 1985b, 1987; López-Giménez, *et al.*, 1997). Los receptores 5-HT₂ activan la hidrólisis de fosfoinosítidos (Boess y Martín, 1994; Sanders-Bush y Canton, 1995; Pritchett, *et al.*, 1988a y b; Julios, *et al.*, 1990; Stam, *et al.*, 1992) y movilización de Ca²⁺ a través de la fosfolipasa C tras la activación inicial de una proteína G (De Chaffoy, *et al.*, 1985; Doyle, *et al.*, 1986). Además activan una corriente entrante que produce la despolarización neuronal, aparentemente mediante el cierre de canales de K⁺ a través de una proteína G (Aghajanian, 1995). El receptor 5-HT_{2B} se encuentra sobretodo en tejidos periféricos donde media, por ejemplo, la contracción del musculo liso (Kursar, *et al.*, 1992). En el cerebro de rata se ha detectado muy poca cantidad de este receptor (Foguet, *et al.*, 1992). Los receptores 5-HT_{2C}, se encuentran en alta densidad en los plexos coroideos (Palacios, *et al.*, 1986). También se han detectado en otras regiones como el sistema límbico y áreas asociadas a la actividad motora, así como en la corteza frontal y piriforme, el núcleo olfatorio, el núcleo subtalámico y el núcleo del Raphé dorsal (Pazos, *et al.*, 1985; Clemett, *et al.*, 2000), aunque en menor proporción que en los plexos coroideos.

Los receptores 5-HT₃ son los únicos receptores a serotonina que producen respuestas directas, es decir, son receptores ionotrópicos que forman un canal catiónico permeable a Na⁺ y K⁺ (Wallis y Elliot, 1991). La activación de este receptor produce una rápida despolarización de la membrana neuronal. Los receptores 5-HT₃ se encuentran en alta densidad en ganglios y nervios periféricos, así como en la sustancia gelatinosa de la médula espinal. La mayor densidad del receptor 5-HT₃ en el cerebro se ha encontrado en regiones como el hipocampo, la amígdala, en capas superficiales de la corteza, el núcleo caudado y el putamen (Abi-Dargham, *et al.*, 1993; Bufton, *et al.*, 1993; Parker, *et al.*, 1996).

Además se ha descrito otro receptor a serotonina en el sistema nervioso central, el tracto gastrointestinal y el corazón, el 5-HT₄. Las características farmacológicas de este receptor no se parecen a las de los otros tres tipos descritos, y debido a que no tiene un radioligando de alta afinidad no se ha podido estudiar mucho. El receptor 5-HT₄ activa a la adenilato ciclasa e inhibe

canales de K⁺, está involucrado en la modulación de la actividad de varias neuronas en el sistema nervioso central, por ejemplo facilita la liberación de acetilcolina (Tonini, *et al.*, 1989, 1992; Craig y Clarke, 1990; Elswood, *et al.*, 1991; Kilbinger, *et al.*, 1995) y modula la liberación de dopamina en el cerebro (Benloucif, *et al.*, 1993; Gale, *et al.*, 1994; Bonhomme, *et al.*, 1995; Steward, *et al.*, 1996).

El receptor 5-HT5 es probablemente el menos comprendido de todos los receptores de serotonina. Este receptor tiene dos subtipos: el receptor 5-HT5A y el receptor 5-HT5B. Se ha mostrado la presencia de tres tipos de RNA mensajero del receptor 5-HT5A en extractos del cerebelo y del cerebro de rata utilizando Northern blot (Erlander, *et al.*, 1993) y con estudios con hibridación *in situ* se mostró que los receptores 5-HT5B se encuentran en baja densidad en el núcleo supraóptico y en el hipotálamo (Erlander, *et al.*, 1993) así como en otras regiones del cerebro de la rata como el núcleo del Raphé dorsal y el bulbo olfatorio. Por estudios de unión a radioligandos se sabe que ambos receptores se encuentran acoplados a proteínas G (Barnes y Sharp, 1999).

El receptor 5-HT6 se encuentra en el núcleo caudado, en el núcleo acumbens y en el hipocampo de la rata. La utilización de algunos antidepresivos que tienen un efecto antagónico con los receptores 5-HT6, sugiere una posible relación entre estos receptores y la depresión (Boess, *et al.*, 1997). Este receptor está acoplado positivamente con la adenilato ciclasa a través de proteínas G (Conner y Mansour, 1990; Schoeffter y Waeber, 1994).

El receptor 5-HT7 tiene una distribución distinta en el sistema nervioso central. En el cerebro de la rata y del cuyo, se encuentra altamente expresado en regiones del tálamo, hipotálamo e hipocampo, mientras que en la corteza cerebral y en la amígdala se encuentran generalmente niveles bajos de expresión de este receptor (To, *et al.*, 1995; Gustafson, *et al.*, 1996; Stowe y Barnes, 1998). El receptor 5-HT7 parece estar implicado en la regulación de los ritmos circadianos, así como en algunos desordenes psiquiátricos. Estudios realizados por Beck y Bacon (1998), mostraron que el receptor 5-HT7 inhibe la hiperpolarización post-estimulación en neuronas piramidales hipocampales en CA3, un efecto análogo al del receptor 5-HT4 en neuronas hipocampales en

CA1. Está acoplado positivamente a la adenilato ciclasa a través de proteínas G (Bard, *et al.*, 1993; Lovenberg, *et al.*, 1993 a, b; Plassat, *et al.*, 1993).

Algunos registros intracelulares con células hipocampales piramidales en rebanadas de cerebro muestran que la serotonina produce hiperpolarizaciones y reduce la resistencia de entrada (Segal, 1980).

Autorreceptores.

Las neuronas serotoninérgicas tanto de vertebrados como de invertebrados tienen autorreceptores de serotonina que participan en la regulación de su actividad eléctrica.

En mamíferos el receptor 5-HT₁ es un autorreceptor que se localiza en el área somatodendrítica de las neuronas serotoninérgicas en los núcleos del Raphé y modula su actividad eléctrica (Verge, *et al.*, 1985; Blier, *et al.*, 1998), produciendo una retroalimentación negativa (Sprouse y Aghajanian, 1987), mientras que los autorreceptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} se han localizado en terminales serotoninérgicas presinápticas en diferentes especies (Göthert, 1990; Stamford, *et al.*, 2000; Sari, 2004).

Cuando se incrementa la concentración de serotonina en el cerebro, por ejemplo después de la administración del L-triptofano o con la aplicación de serotonina exógena, la actividad de las neuronas serotoninérgicas disminuye (Gallager y Aghajanian, 1976; Trulson y Jacobs, 1976). La aplicación microiontoforética de serotonina suprime reversiblemente el disparo espontáneo en células serotoninérgicas de la rata (Sprouse y Aghajanian, 1988). Además, algunos estudios han mostrado que la autoinhibición de serotonina en cortes del Raphé en ratas es dependiente de L-triptofano y de la triptofano hidroxilasa activada por cinasas; la actividad en algunos de los cortes no se ve afectada por los antagonistas de los receptores 5HT_{1A} debido al bajo contenido de serotonina en éstos. Al restablecer el nivel de serotonina con la adición de L-triptofano se restablece la síntesis de serotonina, lo cual rehabilita la autoinhibición mediada por los receptores 5HT_{1A} (Liu, *et al.*, 2005).

La aplicación de agonistas de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} o 5-HT_{1D} suprime el disparo espontáneo en neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal

del Raphé. Los efectos producidos por la aplicación de agonistas así como por la aplicación exógena de serotonina se han observado en diferentes especies: incluyendo la rata (Rogawski y Aghajanian, 1981; Gobert, *et al.*, 1995; De Montgny y Aghajanian, 1977; VanderMaelen, *et al.*, 1986; Sprouse y Aghajanian, 1987; Sinton y Fallon, 1988) el gato (Fornal, *et al.*, 1994; Casimir, *et al.*, 1994) y el ratón (Trulson y Crisp, 1986; Trulson y Frederickson, 1987; VanderMaelen, *et al.*, 1986; Sprouse y Aghajanian, 1987; Sinton y Fallon, 1988). Además se ha demostrado que la administración sistémica o local de agonistas selectivos del receptor 5HT1A en el núcleo de Raphé inhibe la síntesis (Hjorth y Magnusson, 1988; Invernizzi, *et al.*, 1991) y liberación (Sharp, *et al.*, 1989; Bonvento, *et al.*, 1992) de serotonina.

Por otro lado se ha observado que la administración de antagonistas del autorreceptor 5-HT1A produce un incremento dependiente de la dosis en el disparo de las neuronas serotoninérgicas (Casimir, *et al.*, 1994). Sin embargo cabe destacar que la eficacia de estas drogas en la supresión de la actividad neuronal, particularmente a bajas dosis, está altamente influenciada por el estado de desarrollo del animal (Casimir, *et al.*, 1994).

La liberación de 5-HT por las dendritas y posiblemente por terminales axónicas en la región del Raphé (Chazal y Ralston, 1987) parece inhibir a las neuronas serotoninérgicas por la activación de autorreceptores somatodendríticos, lo cual produce una hiperpolarización de la membrana celular al incrementar la conductancia de potasio (Aghajanian y Lakoski, 1984).

Estudios donde se usaron animales anestesiados, no mostraron cambios en la actividad espontánea de las neuronas serotoninérgicas del núcleo del Raphé dorsal después de bloquear farmacológicamente a los autorreceptores de serotonina con la administración sistémica de espiperona. Esto se podría atribuir a la baja actividad espontánea de las neuronas serotoninérgicas bajo anestesia, correspondiente a un nivel bajo de serotonina endógena liberada (Lum y Piercey, 1988; Blier, *et al.*, 1998).

La sensibilidad de los autorreceptores somatodendríticos serotoninérgicos varía en los diferentes grupos de células del Raphé. Por ejemplo, las neuronas del núcleo del Raphé caudal (Raphé pálido y Raphé magno) presentan una respuesta menor a los agonistas del autorreceptor 5-HT1, tales como el 5-

MeODMT y LSD, que las neuronas del núcleo del Raphé rostral (Heym, *et al.*, 1982; Jacobs, *et al.*, 1983; Fornal y Jacobs, 1988). En gatos las neuronas serotonérgicas del núcleo del Raphé son más sensibles que las neuronas serotonérgicas del núcleo central del Raphé a la aplicación sistémica de agonistas selectivos a 5-HT_{1A} como el 8-OH-DPAT y la ipsapirona (Tada, *et al.*, 1991). Por otro lado en células piramidales de rata el efecto inhibitor producido por agonistas del receptor 5HT_{1A} es pequeño comparado con el efecto producido por la aplicación de serotonina exógena. A su vez el receptor 5HT_{1B} produce un efecto débil e irregular comparado con el receptor 5HT_{1A} (Sprouse y Aghajanian, 1987). En resumen, la autoinhibición en cada tipo de neuronas serotonérgicas es diferente a pesar de la presencia de autorreceptores en todas ellas.

La existencia de un control de retroalimentación negativo en los receptores 5HT_{1A} ha sido cuestionado (Kalsner, 2000). Se ha propuesto que los autorreceptores 5HT_{1A} no controlan la actividad serotonérgica en condiciones fisiológicas sino que funcionan como sensor en respuesta a excesos de serotonina patológicos o farmacológicos (Adell, *et al.*, 2002).

En ganglios del sistema nervioso central de la langosta (Heinrich, *et al.*, 1999) y de la sanguijuela (Gocht y Heinrich, 2007; Rose, *et al.*, 2006), las neuronas serotonérgicas tienen un periodo de inhibición del disparo espontáneo después de una estimulación prolongada. Al aumentar la amplitud o la duración del pulso de corriente de estimulación, hay un aumento en la duración de la autoinhibición post-activación. Sin embargo, la autoinhibición post-activación no es afectada por el vaciamiento de la reserva de serotonina mediante la inyección repetida de 5,7-dihidroxitriptamina, por lo que se ha propuesto que la autoinhibición que se observa en estas neuronas no es producida por la serotonina, sino por cambios en las propiedades intrínsecas de la membrana (Gocht y Heinrich, 2007; Rose, *et al.*, 2006).

La mayor parte de la evidencia que existe sobre autorregulación en neuronas serotonérgicas proviene de estudios en los que se aplicaron agonistas o antagonistas de los autorreceptores serotonérgicos y se observó un efecto ya sea en la actividad eléctrica de las neuronas serotonérgicas o en la cantidad de serotonina en el fluido extracelular. En estos experimentos, los

fármacos afectan la respuesta de las neuronas serotoninérgicas a la serotonina que ya se encuentra en el fluido extracelular en condiciones estacionarias, es decir la respuesta al llamado “tono” serotoninérgico (ver Bunin y Wightman, 1999). Sin embargo, no hay un estudio detallado de cómo la serotonina regula la actividad de la neurona en tiempo real en el momento de ser liberada.

Además, se sabe poco sobre cómo la serotonina liberada afecta en ese momento su propia liberación (ver Chapul, *et al.*, 1996; Piñeyro, *et al.*, 1996). En este trabajo estudiamos el efecto en tiempo real de la serotonina liberada en la actividad eléctrica de las propias neuronas y en la liberación sináptica, utilizando neuronas identificadas aisladas del sistema nervioso central de la sanguijuela.

Sistema nervioso de la sanguijuela.

En este trabajo se utilizaron neuronas de Retzius aisladas del sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*. En esta sección se describe este sistema nervioso con el fin de exponer las ventajas de esta preparación.

Las sanguijuelas son anélidos pertenecientes a la clase Hirudinea. Su sistema nervioso central está conformado por una cadena ganglionar con un ganglio cefálico formado por la fusión de cuatro ganglios, un ganglio caudal formado por la fusión de siete ganglios y 21 ganglios segmentales que son similares entre sí (Figura 3A) y contienen alrededor de 400 neuronas cada uno. La mayoría de las neuronas han sido identificadas por su función, su forma, su patrón de actividad eléctrica y su localización (Nicholls y Baylor, 1968). Dentro del ganglio se encuentran los somas neuronales (Figura 3B) y parte de las neuritas, que forman el neuropilo. Algunas neuronas envían prolongaciones ya sea a través de las raíces laterales para inervar los órganos internos, músculos, piel y glándulas en la pared corporal, o a través de los nervios conectivos, para conectarse con neuronas en los ganglios adyacentes (Payton, 1981).

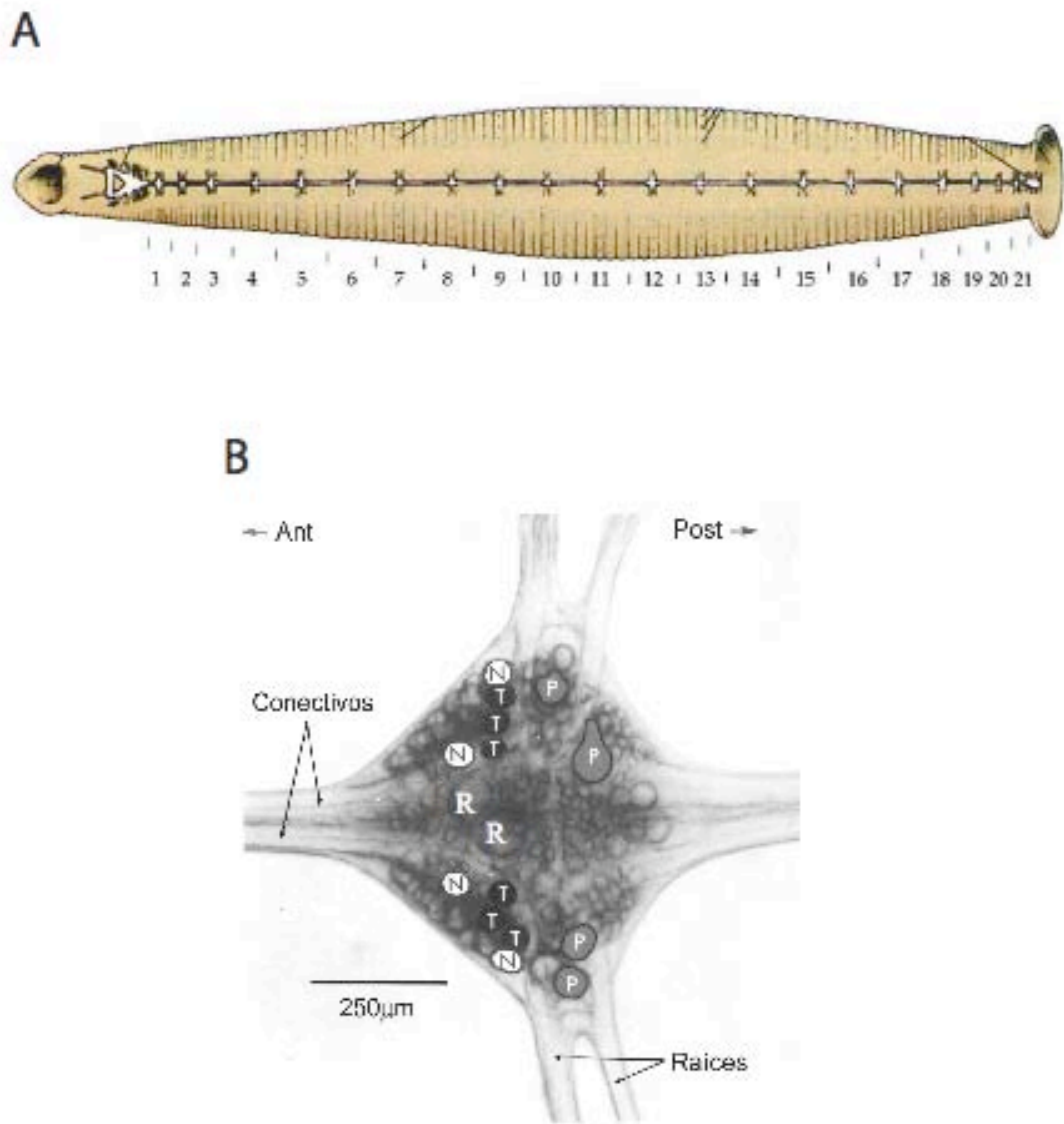


Figura 3.- Sistema nervioso de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*. A) Esquema del sistema nervioso compuesto por una cadena con 21 ganglios similares, y dos masas nerviosas formados por la fusión de varios ganglios, una anterior y otra posterior (imagen superior). B) Micrografía de un ganglio nervioso, cada ganglio presenta alrededor de 400 neuronas. Las neuronas de Retzius (R) son las neuronas más grandes de cada ganglio (tomado de Nicholls y Baylor, 1968).

A diferencia del sistema nervioso central de los mamíferos, el de los invertebrados tiene la capacidad de regenerar después de una lesión (Baylor y Nicholls, 1971; Jahnsen y Nicholls, 1972). Esto ha permitido aislar neuronas

individuales y mantenerlas en cultivo, en donde sobreviven por semanas, conservando sus características fisiológicas distintivas, tales como la forma de sus potenciales de acción y los transmisores que liberan. Además, si se ponen en contacto con un blanco adecuado forman sinapsis específicas (Fuchs, *et al.*, 1981). Como estas sinapsis se forman cerca del soma, los registros pre y postsinápticos reflejan fielmente lo que ocurre en la terminal sináptica (Nicholls y Kuffler, 1990).

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 sigue en su desarrollo, de la capacidad de regeneración y del repertorio limitado de comportamientos que presenta (Blackshaw, *et al.*, 1988). Cada neurona se repite de un ganglio a otro, de espécimen a otro, e incluso entre distintas especies. Las neuronas tienen somas con diámetros de entre 10 y 80 μm , lo cual facilita realizar registros electrofisiológicos en ellos.

En la sanguijuela se ha estudiado extensivamente el desarrollo del sistema nervioso central, 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), así como el funcionamiento de las neuronas y de los receptores mecanosensoriales (Nicholls y Baylor, 1968; Blackshaw y Thompson, 1988; Blackshaw, *et al.*, 1988).

Sistema serotoninérgico en sanguijuelas.

Se han identificado varias neuronas serotoninérgicas en los ganglios de éste sistema nervioso, por tinción con el colorante rojo neutro (Lent y Frazer, 1977). En la mayoría de los ganglios segmentales hay siete neuronas serotoninérgicas: las dos neuronas de Retzius, que son las neuronas de mayor tamaño en el ganglio y contienen el 50% de la serotonina de la sanguijuela, dos pares de neuronas laterales localizados uno en la parte dorsal del ganglio (también llamadas células 21) y otro en la parte ventral (llamadas células 61), y una célula en el paquete medial posterior. Los tres primeros ganglios de la cadena presentan además un par de neuronas en el paquete medial anterior, cerca de las neuronas de Retzius. 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 sistema nervioso central.

La serotonina regula una gran cantidad de funciones fisiológicas en la sanguijuela, la mayoría de ellas relacionadas con la conducta alimenticia.

Cuando las sanguijuelas están hambrientas por lo general se encuentran en aguas poco profundas. Cuando detectan movimientos en el agua, que podrían provenir de una posible presa, empiezan a nadar hacia la fuente del movimiento. Las neuronas serotoninérgicas desempeñan un papel fundamental en la iniciación del nado.

Las neuronas mecanosensoriales excitan a varias de las neuronas serotoninérgicas, incluyendo las neuronas de Retzius y las 21 y 61 a través de una vía polisináptica (Nusbaum y Kristan, 1986). La estimulación de las células 21 y/o 61 causa la iniciación de episodios de nado en cadenas ganglionares (Nusbaum y Kristan, 1986), ya que éstas células a su vez excitan a interneuronas generadoras del patrón central del nado. El patrón de nado en estos organismos está coordinado por una serie de interneuronas que cuando se activan presentan una actividad osciladora. Estas interneuronas estimulan e inhiben de manera rítmica a las motoneuronas excitadoras e inhibitoras de los músculos longitudinales ventrales y dorsales de manera alternada. La activación de este patrón central ocurre de manera progresiva a lo largo de la

cadena de ganglios, lo que da lugar a ondulaciones del cuerpo de adelante hacia atrás (Friesen, *et al.*, 1976).

La estimulación de las neuronas de Retzius o la aplicación de serotonina en el baño también produce episodios de nado (Willard, 1981). Esto ocurre porque la serotonina modula la actividad de algunas de las interneuronas osciladoras que pueden iniciar la actividad rítmica del circuito que produce el nado.

Una vez que la sanguijuela encuentra una posible presa, comienza una fase de exploración. Tanto en la fase de nado como en la fase de exploración, hay un incremento en la actividad de las neuronas serotoninérgicas (Wilson, *et al.*, 1996). Cuando los labios de la sanguijuela sienten una superficie tibia, se activan algunas neuronas serotoninérgicas que promueven la ingestión. La serotonina activa la ingesta, estimulando directamente a las glándulas salivales para secretar saliva, a las mandíbulas para morder y a la faringe para generar movimientos peristálticos, que continúan durante toda la fase de ingestión.

Durante la ingestión, las sanguijuelas relajan los músculos de la pared corporal e incrementan la cantidad de moco en la piel. Las neuronas de Retzius estimulan directamente la secreción de moco en las glándulas mucosas de la pared corporal (Lent, 1973).

La distensión de la pared corporal después de la alimentación hiperpolariza a las neuronas serotoninérgicas, lo que produce un estado de saciedad que termina la ingestión (Groome, *et al.*, 1993). Las sanguijuelas saciadas tienen una menor cantidad de serotonina en el sistema nervioso central y en la sangre que las hambrientas (Groome, *et al.*, 1993) y se sitúan en aguas más profundas o en el fondo de los estanques, nadando mucho menos.

La administración o la eliminación de serotonina causa alteraciones en la conducta alimenticia de estos animales, tales como hiperfagia y anorexia respectivamente (Lent, 1985).

Sinapsis Retzius – P

Si se pone en contacto el muñon de una neurona de Retzius aislada del sistema nervioso con una neurona mecanosensorial sensible a presión (a la que se llama célula P) en cultivo, se forma una sinapsis química unidireccional inhibitoria similar a la que forman en ganglio (Fuchs, *et al.*, 1982), donde la célula de Retzius es siempre presináptica (Fuchs, *et al.*, 1982; Liu y Nicholls, 1989). En ésta sinapsis, la serotonina se libera de manera cuántica, dependiente de calcio (Henderson, *et al.*, 1983) y del potencial de membrana presináptico (Dietzel, *et al.*, 1986) y en la célula P se producen potenciales sinápticos mediados por corrientes de cloro (Henderson, *et al.*, 1983). La sinapsis muestra facilitación o depresión dependiendo de las condiciones de estimulación (Dietzel, *et al.*, 1986; Fuchs, *et al.*, 1982).

La serotonina es el principal neurotransmisor en las células de Retzius, y tal vez el único (Rude, *et al.*, 1969). El soma de las neuronas de Retzius tiene alrededor de 80 μm de diámetro, por lo que es muy accesible para registros electrofisiológicos. Mediante microscopía electrónica se ha mostrado que en las terminales sinápticas de las neuronas de Retzius la serotonina se encuentra tanto en vesículas claras como en vesículas de núcleo denso (Kuffler, *et al.*, 1987; Bruns y Jahn, 1995). Registros amperométricos realizados por Bruns y Jahn (1995) mostraron que mientras las vesículas claras contienen 4,000 moléculas de serotonina, las de núcleo denso contienen 64,000 (17 veces más serotonina que las claras). El soma de estas neuronas contiene sólo vesículas de núcleo denso (Bruns, *et al.*, 2000; Trueta *et al.*, 2003a).

Receptores serotoninérgicos en sanguijuela.

La transmisión sináptica química entre pares de neuronas de Retzius y entre neuronas de Retzius y células P es mediada por serotonina, que activa conductancias de cloro a través de al menos un receptor ionotrópico (Henderson, 1983; Liu y Nicholls, 1989; Lessman y Dietzel, 1991) y uno metabotrópico acoplado a la producción de AMP cíclico y a la activación de la cinasa de proteínas tipo A (Sanchez-Armass, *et al.*, 1991).

Las neuronas de Retzius presentan los mismos receptores en etapas embrionarias que en sanguijuelas adultas (Lessmann y Dietzel, 1991).

Además en células P existe otro receptor farmacológicamente similar al 5-HT₂, que activa pequeñas conductancias catiónicas monovalentes mediante la activación de la cinasa de proteínas tipo C (Drapeau y Sánchez-Armass, 1988; Drapeau, *et al.*, 1989; Sánchez-Armass, *et al.*, 1991). Este receptor parece ser extrasináptico ya que cuando se forman sinapsis Retzius-P en cultivo, desaparecen las conductancias catiónicas que se observan en células P aisladas (Drapeau y Sánchez-Armass, 1988; Drapeau, *et al.*, 1989). No se ha determinado el papel fisiológico de la respuesta despolarizante producida por las conductancias catiónicas.

Se ha especulado que tanto la dopamina como la serotonina se unen a los mismos receptores en la sanguijuela (Leake y Walker, 1980). El grupo de Drapeau investigó esta posibilidad y encontraron que la serotonina activa canales de cloro de manera ionotrópica, mientras que la dopamina induce un incremento en la actividad de los mismos canales de cloro pero por la vía del AMPc al activar a la proteína cinasa A, es decir de manera metabotrópica (Ali, *et al.*, 1998).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace décadas es conocido que la serotonina tiene un efecto de autorregulación sobre las neuronas serotoninérgicas, tanto en vertebrados (Rogawski y Aghajanian, 1981; Gobert, *et al.*, 1995; De Montgny y Aghajanian, 1977; VanderMaelen, *et al.*, 1986; Sprouse y Aghajanian, 1987; Sinton y Fallon, 1988; Fornal, *et al.*, 1994; Casimir, *et al.*, 1994; Trulson y Crisp, 1986; Trulson y Frederickson, 1987) como en invertebrados (Heinrich, *et al.*, 1999; Gocht y Heinrich, 2007; Rose, *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados sobre autorregulación en neuronas serotoninérgicas han consistido en aplicar agonistas o antagonistas de los autorreceptores serotoninérgicos y analizar cómo se altera la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas, o la concentración de serotonina en el fluido extracelular, lejos de los sitios de liberación. Esta estrategia experimental altera principalmente el tono serotoninérgico, es decir la cantidad de serotonina que hay en el fluido extracelular en el estado estacionario (ver Bunin y Wightman, 1999) y por ello, proveen una evidencia indirecta de cómo la serotonina que ya se encuentra bañando a los circuitos neuronales afecta a las propias neuronas serotoninérgicas. Sin embargo, no existe un análisis detallado, de cómo la serotonina regula la actividad de las propias neuronas serotoninérgicas en tiempo real mientras está siendo liberada. Además, se conoce poco sobre cómo la serotonina liberada afecta su propia liberación en las terminales sinápticas en ese momento (ver Chaput, *et al.*, 1986; Piñeyro, *et al.*, 1996).

En este trabajo estudiamos el efecto que produce la serotonina en el momento de ser liberada sobre la excitabilidad de las propias neuronas serotoninérgicas y sobre su propia liberación en las terminales sinápticas. Para ello utilizamos neuronas serotoninérgicas de Retzius, aisladas del sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*. La serotonina en las neuronas de Retzius, al igual que en otras neuronas de este sistema nervioso (Henderson, *et al.*, 1983; Dietzel, *et al.*, 1986; Liu y Nicholls, 1989; Fernández de Miguel y Drapeau, 1995) produce una hiperpolarización dependiente de corrientes de cloro (Lessmann y Dietzel, 1991). Dado que las neuronas de Retzius liberan serotonina, al menos algunos de los receptores a serotonina

que presentan podrían ser autorreceptores y responder a la serotonina liberada por la propia neurona. Esto, junto con las ventajas que ofrece poder aislar las neuronas y mantenerlas en cultivo ya sea solas o formando sinapsis con neuronas blanco adecuadas, hace de las neuronas de Retzius una preparación ideal para estudiar la autorregulación serotoninérgica en tiempo real, pues nos permite estudiar los mecanismos de acción.

HIPÓTESIS:

Si las neuronas de Retzius liberan serotonina y las terminales presinápticas tienen autorreceptores para la misma, entonces la serotonina liberada en respuesta a la estimulación podría producir un efecto sobre las propias neuronas en el momento de ser liberada. Si los autorreceptores en las terminales presinápticas activan corrientes de cloro, entonces la serotonina liberada por las neuronas de Retzius podría disminuir la excitabilidad de las propias neuronas en el momento de ser liberada, y disminuir así la liberación subsecuente de serotonina de las terminales presinápticas.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto que produce la serotonina en el momento de ser liberada sobre la excitabilidad de las propias neuronas serotonérgicas y sobre su propia liberación en las terminales sinápticas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Determinar si la hiperpolarización que presentan las neuronas de Retzius después de la estimulación es producida por la serotonina liberada por las propias neuronas.
- 2.- Determinar si la serotonina disminuye la excitabilidad de las neuronas de Retzius en el momento de ser liberada.
- 3.- Determinar si la serotonina liberada por las neuronas de Retzius regula la liberación subsecuente en las terminales presinápticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y cultivo neuronal

Los experimentos se realizaron con neuronas de Retzius, aisladas del sistema nervioso central de sanguijuelas *Hirudo medicinalis* adultas. La cadena de ganglios que forma al sistema nervioso central se aisló bajo un microscopio estereoscópico, conservando las raíces de los ganglios segmentales unidas a tejido conectivo para facilitar su sujeción posterior. Durante la disección se mantuvo al animal bañado en una solución Ringer que contenía (en mM): NaCl 120; KCl 4; CaCl₂ 2; tris-maleato 10. El pH se ajustó a 7.4 con HCl o NaOH. 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 (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) 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 colagenasa-dispasa 2 mg/ml (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) durante 45 a 60 minutos, después de lo cual las neuronas de Retzius se identificaron visualmente por su localización en el ganglio y su tamaño característico: las dos neuronas de Retzius son las mayores en cada ganglio y se encuentran en la parte central (Figura 4). Las neuronas se aislaron una por una mediante la aplicación de succión a través de una micropipeta de vidrio, con lo que se obtuvo el soma unido a una parte del proceso primario, al que nos referimos como “muñon”.

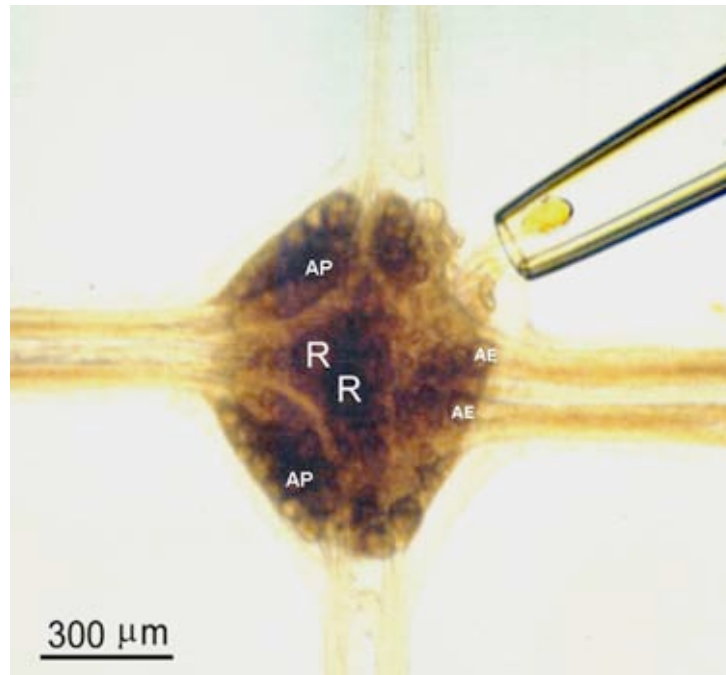


Figura 4 .- Aislamiento de neuronas identificadas de un ganglio de sanguijuela. La pipeta esta aislando una célula P. (R = neurona de Retzius). Tomado de Dietzel, *et al.*, 1986.

Las neuronas se enjuagaron varias veces con el medio de cultivo descrito, dentro de una campana de flujo laminar para limpiarlas y mantenerlas en condiciones de esterilidad, y se sembraron en platos de cultivo (Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA), utilizando concanavalina-A (2 mg/ml) como substrato (Sigma, St. Louis, MO, USA) y el medio de cultivo descrito anteriormente. Se mantuvieron a 18-20°C y se registraron entre 1 y 7 días después de haberlas sembrado.

Para algunos experimentos se utilizaron sinapsis formadas en cultivo, colocando la punta del muñón de una célula de Retzius en contacto con el soma de una célula P (Figura 5).

Los pares Retzius-P se registraron después de 5 días en cultivo para garantizar la formación de las sinapsis.

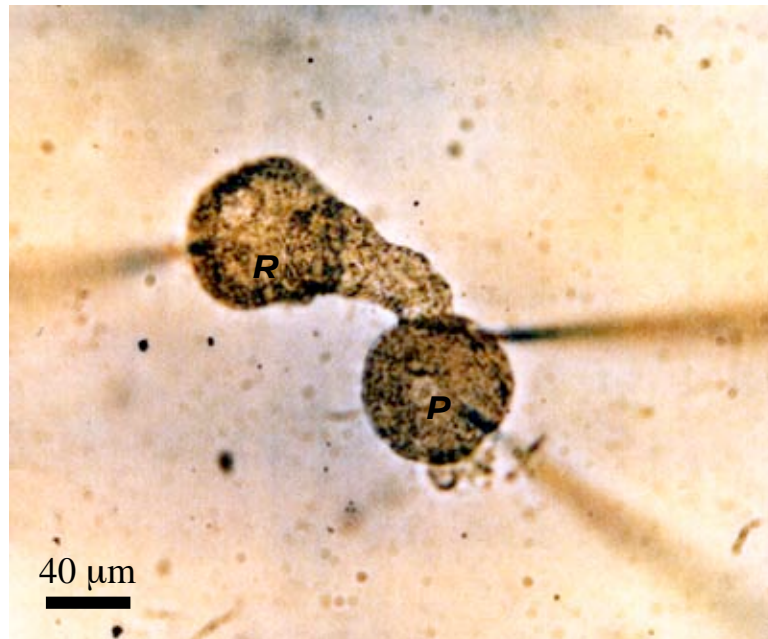


Figura 5 .- Sinapsis entre una neurona de Retzius y una célula P en cultivo. El muñón de la neurona de Retzius (R) hace contacto con el soma de la célula P (P).

Antes de realizar los experimentos se comprobó que las neuronas que mantuvimos en cultivo estuvieran en buenas condiciones. Esto se hizo en primer lugar por inspección visual utilizando un microscopio invertido (Nikon, Diaphot). Las neuronas que no están saludables se ven oscuras y pueden presentar burbujas en la membrana, por lo que se corroboró que las neuronas que íbamos a utilizar en nuestros experimentos no presentarían ninguna de estas características. Otra forma de comprobar que las neuronas estuvieran sanas fue realizar registros electrofisiológicos y corroborar que tanto el potencial de reposo como la forma del potencial de acción tuvieran las características reportadas para cada tipo neuronal. En las neuronas de sanguijuela la actividad eléctrica de cada tipo neuronal está muy bien caracterizada y es un rasgo que nos permite identificarlas (Baylor y Nicholls, 1971). Las células de Retzius sanas tienen un potencial de reposo cercano a -60mV ; por su parte las células P tienen un potencial de reposo de -50mV .

Registro intracelular

Para estimular y registrar la actividad eléctrica de las neuronas de Retzius, se fabricaron microelectrodos intracelulares a partir de tubos capilares de borosilicato de pared delgada, con un diámetro externo de 1.0mm, y un diámetro interno de 0.75mm, y con un filamento interno (Federick Haer y Co), utilizando un estirador de pipetas Sutter P-97. Se usaron microelectrodos con una resistencia de 18-25 M Ω , llenos de acetato de potasio (KAc) 4M o en algunos experimentos llenos de cloruro de potasio (KCl) 3M para invertir el gradiente transmembranal de cloro. Se utilizó un amplificador para registro intracelular Axoclamp 2A (Axon Instruments, Unión City, CA, USA) en modo de balance de puente. Las neuronas se estimularon inyectando pulsos únicos o trenes de pulsos de corriente a diferentes frecuencias entre 1 y 50 Hz, utilizando un estimulador Grass S88 conectado a una unidad de aislamiento SIU5 (Grass Instruments, W. Warwick, RI, USA). Entre una estimulación y otra transcurrieron al menos 2 minutos para permitir la recuperación de la poza de vesículas disponibles.

En algunos experimentos, se realizaron registros en modo de fijación de voltaje con un microelectrodo, utilizando una frecuencia de muestreo entre 2 y 5 KHz. En estas condiciones, el voltaje durante el tren de pulsos no pudo ser fijado al estimular a altas frecuencias, pero sí después de la estimulación, permitiendo ver la dirección de la corriente transmembranal observada después del tren de impulsos. En este caso cabe aclarar que según la convención de Franklin, cuando entran corrientes negativas de cloro hablamos de una corriente saliente, y en el caso en que salen corrientes negativas de cloro hablamos de una corriente entrante.

Los registros fueron digitalizados por medio de un convertidor analógico-digital Digidata 1320 (Axon Instruments) utilizando el programa pCLAMP9 (Axon Instruments) y se almacenaron en una computadora PC.

Estimaciones de cambios en la resistencia membranal

Para estudiar el efecto de la serotonina en la resistencia de la membrana se aplicaron pulsos de corriente hiperpolarizante de 120 pA y 200 ms a 1Hz. Se calculó la constante de tiempo (τ) de las neuronas ajustando una función exponencial al registro de voltaje en respuesta a cada pulso de corriente hiperpolarizante, utilizando el software Clampfit 9 (Axon Instruments). Aunque convencionalmente para calcular la resistencia de entrada se mide la amplitud de la respuesta en voltaje en el estado estacionario, utilizamos este ajuste para estimar cambios en la resistencia de entrada porque la constante de tiempo de estas neuronas es muy larga y se necesitan pulsos de corriente muy largos para llegar al estado estacionario, lo cual limita mucho la frecuencia a la que se puede medir la resistencia. Suponiendo que la capacitancia de la membrana y la resistencia interna permanecen constantes durante el experimento, las variaciones en la constante de tiempo son directamente proporcionales a los cambios en la resistencia de la membrana.

Aplicación de serotonina por iontoforésis

Para determinar la respuesta de las neuronas de Retzius a la serotonina se les aplicó éste transmisor por iontoforésis utilizando microelectrodos similares a los usados en los registros intracelulares llenos de una solución de serotonina (5-hydroxytryptamine (5-HT) HCl, Sigma) 0.1M en Ringer. Dado que la serotonina tiene una carga positiva, se aplicó una corriente directa de -1nA utilizando un amplificador intracelular (Getting, USA), para retener la serotonina dentro del microelectrodo. Para aplicar pulsos iontoforéticos a las neuronas, se colocó la punta del microelectrodo lleno con serotonina muy cerca del soma de la neurona y se aplicaron pulsos de corriente positiva de una amplitud de 10nA y una duración de 30 ms.

Como control negativo se registraron las respuestas intracelulares de neuronas a las que se les aplicó pulsos iontoforéticos de la misma amplitud y duración pero con microelectrodos llenos de Ringer. Como control alterno en

algunos registros se aplicaron pulsos negativos de corriente a la pipeta de serotonina. En estos casos las neuronas tratadas con reserpina no presentaron respuestas (no se muestran los datos).

Soluciones y tratamientos farmacológicos

Para determinar el papel de la secreción de serotonina en la respuesta post-estimulación se realizaron registros inicialmente con las neuronas en una solución fisiológica que contenía (en mM): NaCl 120; KCl 4; CaCl₂ 2; tris-maleato 10; N-metil D-glucamina 66. Después de registrar la respuesta de las neuronas a la estimulación en estas condiciones, se cambió la solución extracelular por una solución fisiológica en la cual el calcio fue substituido por magnesio (en mM): NaCl 120; KCl 4; MgCl₂ 2; tris-maleato 10; N-metil D-glucamina 66, para evitar la secreción. El cambio se realizó perfundiendo por 5 minutos a una velocidad aproximada de 3 ml/minuto, y posteriormente se registraron las respuestas a la estimulación en estas condiciones. Por último se perfundió de nuevo con solución fisiológica normal para registrar la recuperación de las respuestas post-estimulación. En estas soluciones se utilizó N-metil D-glucamina como osmolito inerte para ajustar la osmolaridad de las soluciones a 330 mosm, similar a la osmolaridad del medio de cultivo.

En algunos experimentos, para vaciar la reserva de serotonina las neuronas se trataron con reserpina (Sigma; 1 μ M tomado de una solución stock 500 μ M disuelta en metanol), la cual fue adicionada en el medio de cultivo al momento de sembrarlas y se mantuvieron durante 7 días con este tratamiento antes de realizar los registros electrofisiológicos, Drapeau, *et al.*, (1989), mostraron que este tratamiento vacía completamente el contenido de serotonina en estas neuronas. Como control negativo se utilizaron neuronas incubadas con metanol (0.2%), que fue utilizado como vehículo para disolver la reserpina. Los registros de las neuronas tratadas con reserpina y las neuronas control fueron realizados en paralelo.

En algunos experimentos se utilizó metisergida, un antagonista poco selectivo de receptores de serotonina (140 μ M preparado a partir de una solución stock 4.2 mM disuelta en Ringer). Después de observar el efecto de la metisergida por 10 minutos, se lavó el fármaco perfundiendo a las células con una solución normal para ver la recuperación. Dado que la metisergida se aplicó manualmente en el medio extracelular con una pipeta, y llegó a las neuronas por difusión, el tiempo de respuesta de las neuronas presentó variabilidad en distintas células. Por ello, se determinó su efecto después de distintos tiempos (3, 5 y 7 minutos) y se reportan los resultados después de todos ellos.

Determinaciones de cambios en la excitabilidad neuronal

Para estudiar cómo la serotonina liberada por la neuronas de Retzius afecta su excitabilidad, analizamos el número de potenciales de acción y de fallas en respuesta a trenes de pulsos de corriente intracelular. Para cada neurona, se encontró la amplitud mínima necesaria para producir un potencial de acción en respuesta a cada pulso de corriente cuando se estimulaba a una frecuencia de 1 Hz. Con esa misma amplitud de corriente se estimuló a la misma célula a frecuencias de 10 y 30 Hz.

El porcentaje de fallas se calculó dividiendo el número de potenciales de acción entre el número total de pulsos de corriente durante el tren de estimulación.

Análisis de la liberación sináptica de serotonina

Para estudiar el efecto de la serotonina liberada por las neuronas de Retzius sobre su propia liberación en las terminales sinápticas, se utilizaron sinapsis formadas entre neuronas de Retzius y neuronas mecanosensoriales sensibles a presión (P) en cultivo. En esta preparación la neurona de Retzius es siempre presináptica y la liberación sináptica de serotonina se puede

cuantificar a partir de la respuesta postsináptica registrada en la célula P (Henderson, *et al.*, 1983; Dietzel, *et al.*, 1986).

El protocolo de estimulación de las neuronas presinápticas de Retzius consistió en la aplicación de un pulso cuadrado de corriente de 10 ms de duración y de amplitud suficiente para producir un potencial de acción (pulso de prueba), seguido después de 5 segundos por un tren de 10 pulsos de la misma amplitud. Este tren se aplicó a diferentes frecuencias entre 1 y 50 Hz, en el intervalo fisiológico de disparo de estas neuronas (Lent y Frazer, 1977; Velázquez-Ulloa, *et al.*, 2003). Las corrientes postsinápticas se registraron en condiciones de fijación de voltaje con un microelectrodo lleno de CsCl₂ 2M de resistencia entre 15 y 20 MΩ. Se utilizaron microelectrodos llenos de CsCl₂ ya que el cesio bloquea canales de potasio y con ello incrementa la resistencia de entrada de las células. Además la inyección de cloro a la célula permite 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).

Para hacer una estimación de la cantidad de serotonina liberada por la terminal presináptica, se calculó la integral de la corriente postsináptica para obtener una estimación de la carga sináptica. Sin embargo, dado que las respuestas sinápticas pueden variar de una sinapsis a otra y presentar variabilidad con respecto al tiempo de registro en la misma sinapsis, normalizamos la respuesta durante los trenes dividiendo la integral de la corriente en respuesta a un tren de 10 pulsos entre 10 veces la integral de la corriente en respuesta al pulso de prueba en cada ensayo.

Para el análisis se utilizaron registros en los que se produjeron fallas durante el tren de pulsos (ocasionadas presumiblemente por la autoinhibición producida por liberación de serotonina) y registros subsecuentes en los que se incrementó la amplitud de los pulsos de corriente para forzar a la neurona a disparar un potencial de acción en respuesta a cada pulso del tren. Se utilizó esta estrategia dado que no existen antagonistas selectivos de los

autorreceptores presinápticos, por lo que no fue posible bloquear la respuesta presináptica a la serotonina sin bloquear también la respuesta postsináptica, lo que haría imposible medir su efecto en nuestras condiciones.

Para estudiar el papel de la serotonina en la modulación del curso temporal de su propia liberación medimos la duración de la fase de caída de las corrientes postsinápticas (midiendo desde el pico de la corriente hasta el regreso a la corriente basal) en respuesta a trenes de 10 pulsos con y sin fallas en los potenciales de acción presinápticos. Además medimos la duración de la fase de caída de las corrientes postsinápticas en respuesta a un potencial de acción o trenes de 10 impulsos presinápticos producidos con microelectrodos llenos de KAc o KCl.

Análisis estadístico

Los resultados que se presentan en gráficas de barras, muestran la media \pm el error estándar estimados a partir de grupos de al menos 6 datos para cada condición. Para comparar las medias se analizó la normalidad y la homogeneidad de varianza usando una prueba de "z" de Kolmogorov-Smirnov y un análisis de Levene respectivamente.

Para comparar las medias de dos grupos independientes se utilizó una "t" de Student. Para comparar más de dos grupos entre sí, se utilizó análisis de varianza (Anova) de una vía, aplicando un análisis de muestras repetidas cuando se trataba de grupos dependientes.

Para comparar el porcentaje de fallas en ausencia y presencia de metisergida, como los datos incluían varios ceros, se utilizó una prueba no paramétrica de Friedman.

Para analizar la transmisión sináptica con y sin fallas en el mismo par de neuronas se utilizó la prueba no paramétrica "t" de Wilcoxon para muestras dependientes.

En todos los casos, se consideró una diferencia significativa cuando la probabilidad de error fue menor al 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Respuesta de las neuronas de Retzius después de la estimulación

Después del potencial de acción, las neuronas de Retzius en condiciones fisiológicas presentan una hiperpolarización postpotencial (Baylor y Nicholls, 1968), que en nuestros registros tuvo una amplitud de $-3.029 \text{ mV} \pm 0.495 \text{ mV}$ y una duración de $590.85 \text{ ms} \pm 111.123 \text{ ms}$. Cuando las neuronas se estimularon con trenes de 10 impulsos a 10 ó 30 Hz utilizando microelectrodos llenos de KAc, se produjo una hiperpolarización postpotencial de $-4.657 \pm 0.887 \text{ mV}$ y $1248.6 \pm 240.1 \text{ ms}$ o de $-6.146 \pm 1.166 \text{ mV}$ y $1422.063 \pm 267.128 \text{ ms}$ respectivamente (Figura 6A). Esta dependencia de la frecuencia de estimulación que presentaron la duración y la amplitud de la hiperpolarización post-estimulación es similar a la que presenta la liberación de serotonina en las neuronas de Retzius, que tanto a partir del soma como de terminales sinápticas se incrementa con la frecuencia de estimulación (Stewart, *et al.*, 1989; Trueta, *et al.*, 2003a; Trueta, 2003b). La serotonina en las neuronas de Retzius, al igual que en otras neuronas de este sistema nervioso (Henderson, *et al.*, 1983; Dietzel, *et al.*, 1986; Liu y Nicholls, 1989) produce una hiperpolarización dependiente de corrientes de cloro (Lessmann y Dietzel, 1991). Esto abrió la posibilidad de que la hiperpolarización observada después de la estimulación fuera producida al menos en parte por la serotonina liberada por las propias neuronas.

Para estudiar esta posibilidad, en primer lugar analizamos si la hiperpolarización después de la estimulación era dependiente de corrientes de cloro. Para ello, invertimos el gradiente transmembranal de cloro inyectando cloruro a las neuronas mediante la utilización de microelectrodos intracelulares llenos de KCl 3M. En estas condiciones la respuesta después del tren de impulsos se invirtió, dando lugar a una despolarización de $15.406 \pm 2.708 \text{ mV}$ después de un tren de 10 impulsos a 30 Hz (Figura 6B). Esta inversión sugiere que la respuesta después de la estimulación se debe a la activación de conductancias de cloro en las neuronas de Retzius.

Dado que el cambio en el voltaje transmembranal después de la estimulación puede ser una hiperpolarización o una despolarización dependiendo del gradiente transmembranal de cloro, para simplificar la descripción de estas respuestas en lo sucesivo me referiré a ellas como “respuesta post-estimulación”.

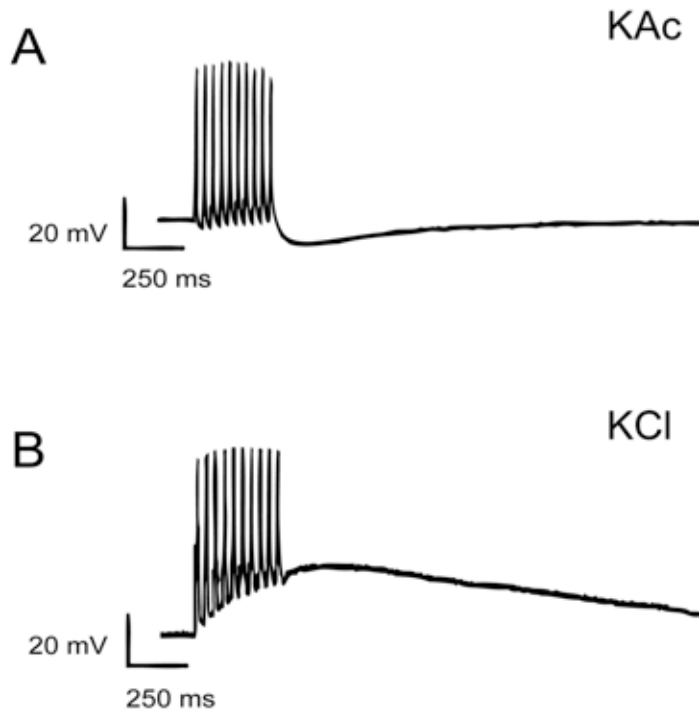


Figura 6.- La dirección de la respuesta post-estimulación depende del gradiente transmembranal de cloro. Registros intracelulares de neuronas de Retzius en cultivo estimuladas con un tren de 10 pulsos despolarizantes a una frecuencia de 30 Hz. A) Neuronas registradas con microelectrodos llenos de KAc mostraron una hiperpolarización después de un tren de impulsos. B) Neuronas con el gradiente transmembranal de cloro invertido por la utilización de un microelectrodo lleno de KCl mostraron una despolarización después de un tren de impulsos.

Para estudiar más a fondo la naturaleza de la respuesta post-estimulación, determinamos la dirección de la corriente transmembranal que se activa en las neuronas de Retzius después de trenes de pulsos despolarizantes. Para ello, realizamos registros en condiciones de fijación de voltaje con un microelectrodo.

Debido al gran tamaño de los somas de las neuronas de Retzius, no es posible fijar el voltaje durante los pulsos despolarizantes utilizando un sólo microelectrodo. Sin embargo fue posible observar la dirección de la corriente transmembranal después de los trenes de estimulación.

En los registros en los que se mantuvo el gradiente transmembranal de cloro fisiológico utilizando microelectrodos llenos de KAc, después de un tren de 10 pulsos despolarizantes a 30 Hz se registró una corriente saliente (Figura 7A). En contraste, en los registros en los que se invirtió el gradiente transmembranal de cloro utilizando microelectrodos llenos de KCl, después de la estimulación se registró una corriente entrante (Figura 7B). Esta inversión dependiente del gradiente transmembranal de cloro confirma que después de la estimulación se activa una corriente de cloro en las neuronas de Retzius y sugiere que la respuesta post-estimulación observada en fijación de corriente se debe a la activación de corrientes de cloro.

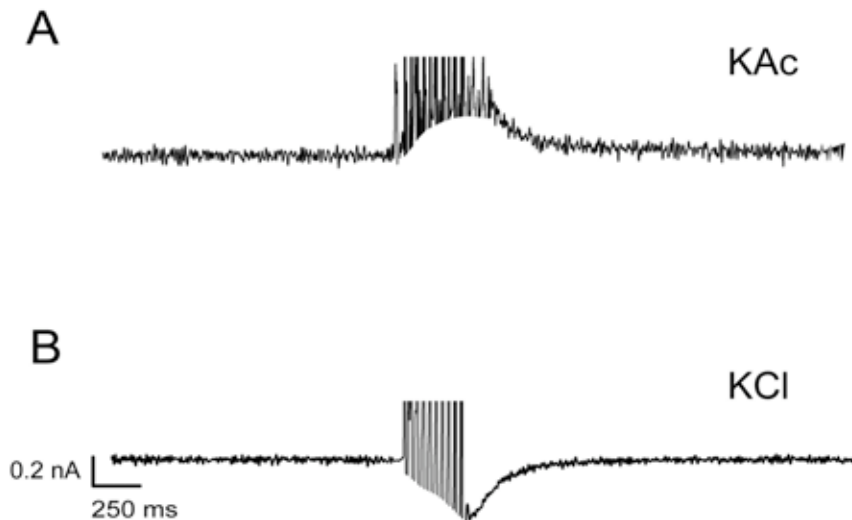


Figura 7.- La dirección de la corriente transmembranal después de la estimulación depende del gradiente transmembranal de cloro.

Registros de la corriente transmembranal en condiciones de fijación de voltaje después de un tren de 10 pulsos despolarizantes de 10 ms a 20 Hz. A) Corriente saliente registrada con un microelectrodo lleno de KAc. B) Corriente entrante registrada en una neurona con el gradiente transmembranal de cloro invertido por la utilización de un microelectrodo lleno de KCl.

Determinación de la respuesta de las neuronas de Retzius a la serotonina

Las neuronas de Retzius liberan serotonina en respuesta a la actividad eléctrica tanto a partir de las terminales sinápticas (Dietzel, *et al.*, 1986) como a partir del soma (Trueta, *et al.*, 2003a). Se ha mostrado que la serotonina activa conductancias de cloro en las neuronas de Retzius (Lessmann y Dietzel, 1995) y en otras neuronas de este sistema nervioso (Henderson, *et al.*, 1983; Dietzel, *et al.*, 1986; Liu y Nicholls, 1989). Para corroborar esto en nuestras preparaciones, registramos de manera directa el efecto de la serotonina aplicada por iontoforésis en las neuronas de Retzius en cultivo.

Las neuronas que se registraron con microelectrodos de KAc respondieron a la serotonina con una hiperpolarización (Figura 8A), mientras

que las registradas con microelectrodos llenos de KCl mostraron una despolarización (Figura 8B).

Como control negativo en estos experimentos, se aplicaron pulsos iontoforéticos con microelectrodos llenos de solución fisiológica sin serotonina. En estas condiciones no se obtuvo respuesta (Figura 8B trazo rojo).

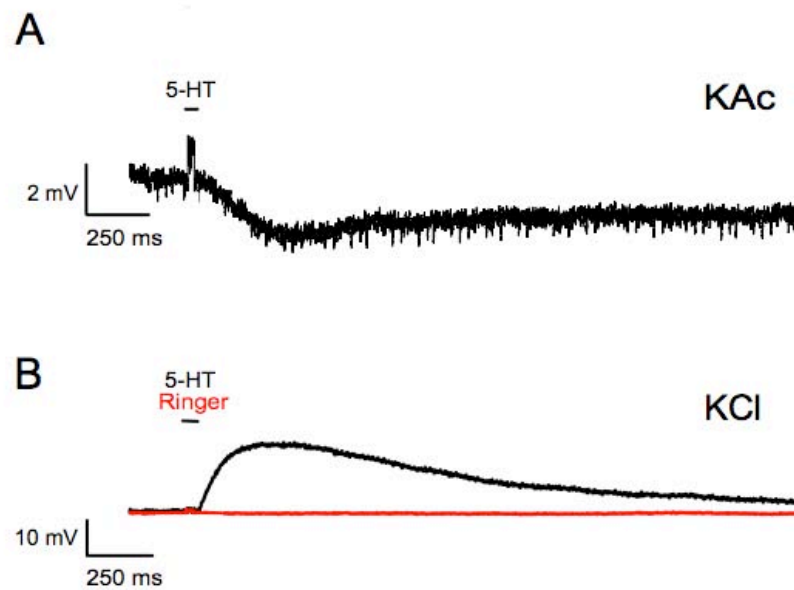


Figura 8.- La respuesta de las neuronas de Retzius a la serotonina es producida por corrientes de cloro. Registros representativos de la respuesta a un pulso iontoforético de serotonina (5-HT; señalado por la barra horizontal). A) Neuronas registradas con microelectrodos llenos de KAc mostraron una hiperpolarización en respuesta a la serotonina. B) Neuronas con el gradiente transmembranal de cloro invertido por la utilización de microelectrodos llenos de KCl mostraron una despolarización en respuesta a la serotonina. El trazo rojo en B) muestra la respuesta de la misma neurona a la aplicación de un pulso iontoforético con una micropipeta llena de Ringer.

La respuesta post-estimulación es producida por la serotonina liberada por las neuronas de Retzius

Dado que la respuesta de las neuronas de Retzius a la serotonina es similar a la respuesta post-estimulación, esta última podría ser producida por la serotonina secretada por las propias neuronas. Para estudiar esta posibilidad, se bloqueó la secreción sustituyendo el calcio de la solución extracelular por magnesio y se analizó la respuesta post-estimulación en 8 neuronas de Retzius con un protocolo similar al descrito anteriormente. Debido a que en condiciones fisiológicas el potencial de equilibrio del cloro es muy cercano al potencial de reposo, es difícil observar cambios en la amplitud de las respuestas producidas por corrientes de cloro. Como ya se mostró, cuando se invierte el gradiente transmembranal de cloro, las respuestas se invierten y se amplifican, haciendo más fácil su observación y manipulación (Henderson, *et al.*, 1983; Dietzel, *et al.*, 1986). Por tal motivo, en los siguientes experimentos se utilizaron microelectrodos llenos de KCl para invertir y amplificar las corrientes de cloro y con ello la respuesta post-estimulación.

Las neuronas registradas con un microelectrodo lleno de KCl en presencia de una solución fisiológica normal presentaron una despolarización de 15.406 ± 2.708 mV ($n=8$) después de un tren de 10 impulsos a 30 Hz, como se había mostrado arriba. Esta despolarización fue abolida reversiblemente al sustituir el calcio por magnesio en la solución extracelular. En estas condiciones se produjo incluso una pequeña hiperpolarización de -2.379 ± 0.802 mV. Esta hiperpolarización es posiblemente producida por corrientes rectificantes de potasio que se activan después del potencial de acción (Stewart, *et al.*, 1989). Al regresar a una solución fisiológica normal, la respuesta post-estimulación se recuperó, mostrando que el bloqueo es reversible.

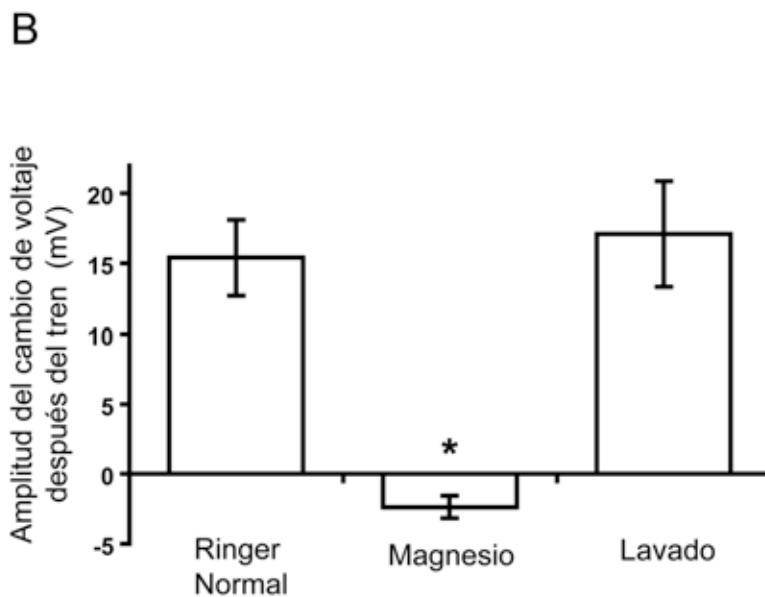
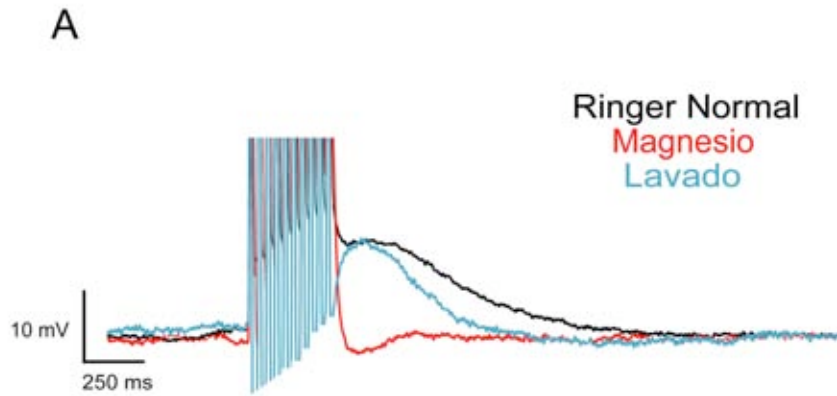


Figura 9.- La respuesta post-estimulación es abolida reversiblemente al bloquear la secreción.

A) Registros representativos de una neurona registrada con un microelectrodo lleno de KCl y estimulada con trenes de 10 pulsos despolarizantes a 30 Hz. En presencia de una solución fisiológica normal se produjo una despolarización después de un tren de impulsos (trazo negro). Al sustituir el calcio por magnesio en la solución extracelular se produjo una hiperpolarización después del tren de impulsos (trazo rojo). Al regresar a una solución fisiológica normal se produjo nuevamente una despolarización después del tren (trazo azul).

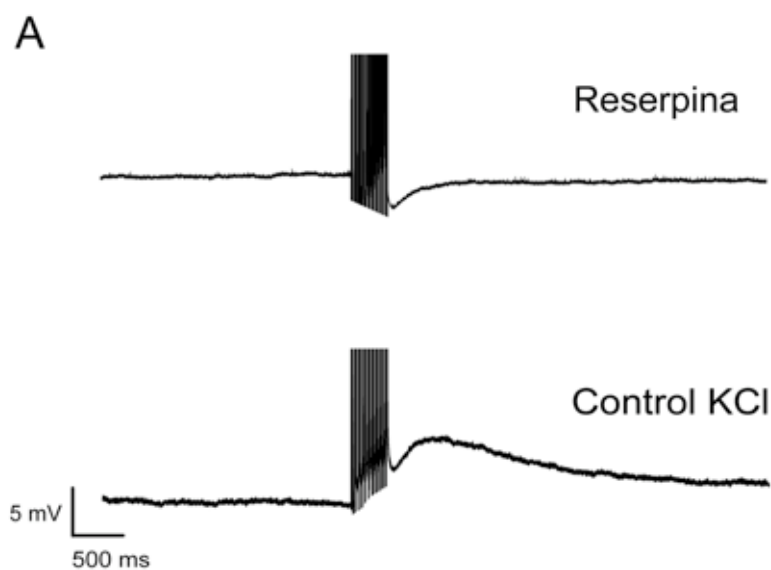
Los potenciales de acción se muestran truncados.

B) Promedio de la amplitud de la respuesta post-estimulación en 8 células. El asterisco muestra una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la respuesta en Ringer normal.

Esto sugiere que la respuesta post-estimulación es producida por alguna sustancia secretada por las propias neuronas. Para corroborar que la secreción de serotonina es responsable de la respuesta post-estimulación, se vació el contenido de serotonina de 7 neuronas de Retzius mediante el tratamiento con reserpina.

Las neuronas tratadas con reserpina y registradas con microelectrodos llenos de KCl no presentaron la respuesta post-estimulación característica de las neuronas control después de un tren de impulsos. Las neuronas tratadas incluso presentaron una pequeña hiperpolarización ($-2.629 \text{ mV} \pm 0.858 \text{ mV}$; $n=7$; Figura 10A, trazo superior). Como en el caso anterior, la hiperpolarización que se observa en estas neuronas es presumiblemente producida por canales de potasio que se activan cuando la célula dispara (Stewart, *et al.*, 1989).

Como control negativo se utilizaron neuronas incubadas con metanol (0.2%), que fue el vehículo utilizado para disolver la reserpina. Las células tratadas con el vehículo sí mostraron una despolarización de $11.148 \text{ mV} \pm 2.187 \text{ mV}$ ($n=7$) después de la estimulación con microelectrodos llenos de KCl (Figura 10A, trazo inferior).



B

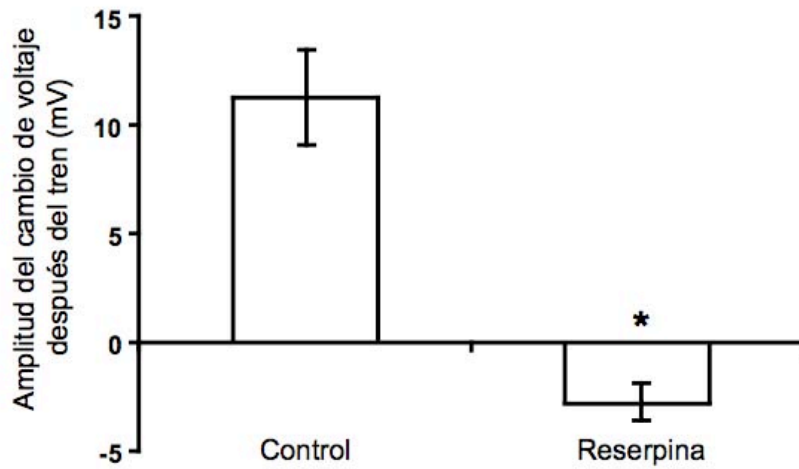


Figura 10.- La respuesta post-estimulación se debe a la liberación de serotonina de las propias neuronas de Retzius.

A) Registros intracelulares representativos de neuronas de Retzius en cultivo estimuladas con un tren de 10 pulsos despolarizantes a una frecuencia de 30Hz con microelectrodos llenos de KCl. Neuronas tratadas con reserpina mostraron una hiperpolarización después de un tren de impulsos (trazo superior). Neuronas incubadas con el vehículo mostraron una despolarización después de un tren de impulsos (trazo inferior).

B) Promedio de la amplitud de la respuesta post-estimulación en 7 células para cada grupo. El asterisco muestra una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las células control.

Para comprobar que la ausencia de la respuesta post-estimulación en las neuronas tratadas con reserpina es producida por la ausencia de serotonina y no por un cambio en la sensibilidad de las neuronas al transmisor, se aplicaron pulsos iontoforéticos de serotonina a las células tratadas con reserpina. Las células tratadas con reserpina y registradas con microelectrodos llenos de KCl respondieron a la serotonina con una despolarización, de manera similar que las células sin tratamiento (Figura 11A). Más aún, cuando a las células tratadas con reserpina se les aplicaron pulsos iontoforéticos de serotonina simultáneamente con pulsos de corriente intracelular, después de un tren de impulsos se produjo una despolarización (Figura 11B) similar a la respuesta post-estimulación observada en las células sin tratamiento. Esto descarta la posibilidad de que la ausencia de respuesta post-estimulación en

las neuronas tratadas con reserpina se deba a un cambio en la sensibilidad a la serotonina.

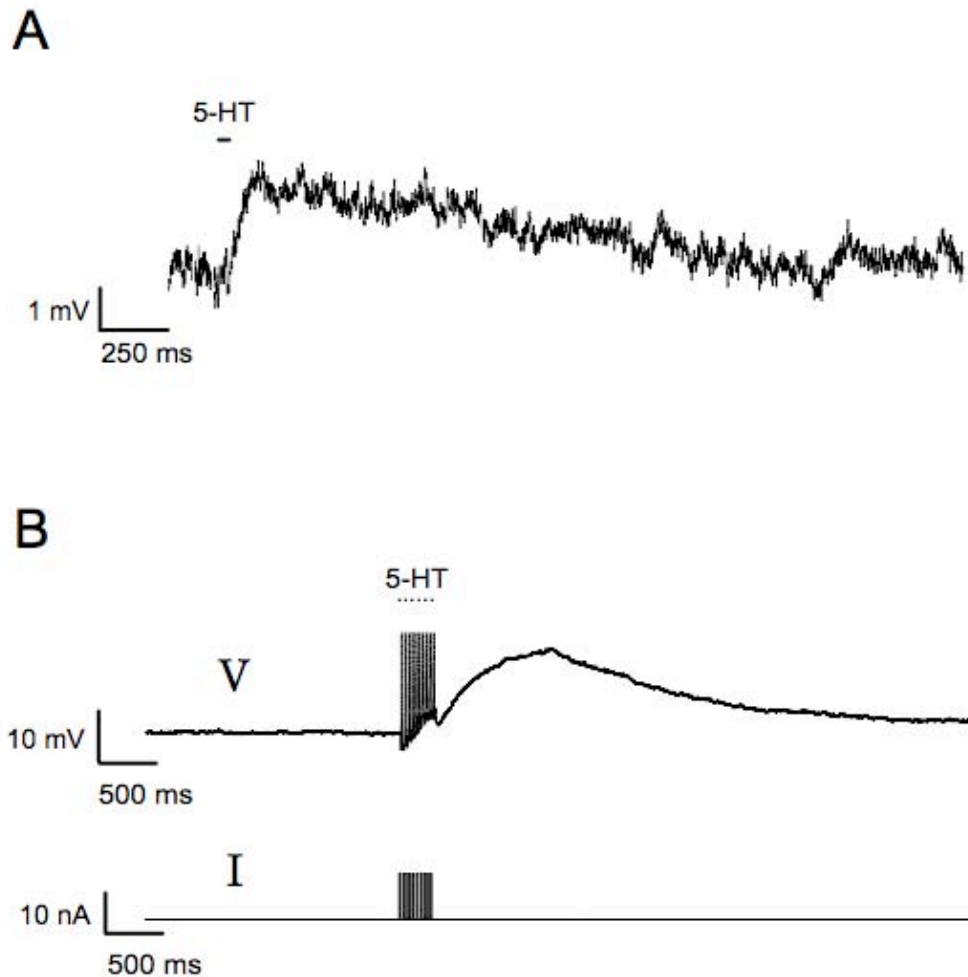


Figura 11.- La ausencia de respuesta post-estimulación en neuronas tratadas con reserpina no se debe a una reducción en la sensibilidad a la serotonina.

A) Las células tratadas con reserpina y registradas con microelectrodos llenos de KCl respondieron a la serotonina con una despolarización.

B) La aplicación de pulsos iontoforéticos de serotonina simultáneamente con pulsos de corriente intracelular a células tratadas con reserpina produjo despolarizaciones después de un tren de 10 impulsos similares a las respuestas post-estimulación en células sin tratamiento. Los potenciales de acción se muestran truncados.

Todos estos resultados sugieren que la respuesta post-estimulación es producida por la serotonina liberada por las propias neuronas de Retzius, que actúa sobre autorreceptores, produciendo en condiciones fisiológicas una hiperpolarización dependiente de corrientes de cloro.

La apertura de canales de cloro en condiciones fisiológicas tiene dos posibles consecuencias: la primera es que si el potencial de equilibrio del cloro es más negativo que el potencial de reposo, se produce una hiperpolarización, que aleja a las neuronas del umbral de disparo. La segunda, a veces menos evidente, es que la activación de conductancias en la membrana reduce su resistencia y con ello hace más difícil cambiar el voltaje membranal. En estas condiciones, la corriente despolarizante que se requiere para llevar a la membrana al umbral de disparo es mucho mayor que con una resistencia membranal más alta. Esto ocurre incluso cuando el potencial de equilibrio del cloro es muy cercano al potencial de reposo y la apertura de los canales de cloro no producen una hiperpolarización evidente. Estas dos acciones tienen como resultado una disminución en la excitabilidad neuronal. Para estudiar si la serotonina liberada por las neuronas de Retzius produce estos efectos, analizamos en primer lugar el efecto que tiene la serotonina sobre la resistencia de entrada, y posteriormente, cómo la liberación de serotonina afecta la excitabilidad de las neuronas.

Efecto de la serotonina en la resistencia de entrada

Para estudiar el efecto de la serotonina en la resistencia de entrada se utilizaron neuronas tratadas con reserpina para eliminar la reserva de serotonina, y de esta manera poder medir la resistencia de entrada en ausencia de la liberación del transmisor. A estas neuronas se les aplicaron pulsos de corriente intracelular hiperpolarizante, y para analizar posibles cambios en la resistencia de entrada, se calculó la constante de tiempo de la membrana ajustando una exponencial al registro de voltaje en respuesta a cada pulso de corriente hiperpolarizante (ver métodos). Después de medir la resistencia de entrada en condiciones basales, se aplicaron trenes de pulsos iontoforéticos de serotonina sincronizados con los pulsos de corriente intracelular.

Suponiendo que la capacitancia de la membrana permanece constante, las variaciones en la constante de tiempo son directamente proporcionales a los cambios en la resistencia de la membrana.

La figura 12 muestra que la aplicación iontoforética de serotonina produjo una disminución significativa y reversible de 23% en la constante de tiempo de las neuronas de Retzius (de 75.091 ± 1.063 ms a 57.531 ± 2.989 ms; $n=6$). La disminución de la constante de tiempo refleja una disminución en la resistencia de entrada, lo cual es una consecuencia esperada de la activación de una corriente. Es de esperarse que la disminución de la resistencia de entrada, sumada a la hiperpolarización post-estimulación que produce la serotonina dificulte que el voltaje membranal alcance el umbral de disparo durante la estimulación, y por lo tanto este mecanismo podría disminuir la excitabilidad de las neuronas. Dado que la liberación de serotonina en las neuronas de Retzius depende de la frecuencia de disparo (Trueta, *et al.*, 2003a; Trueta y De-Miguel, en preparación), para estudiar esta posibilidad analizamos cómo cambia la excitabilidad en función de la frecuencia de estimulación.

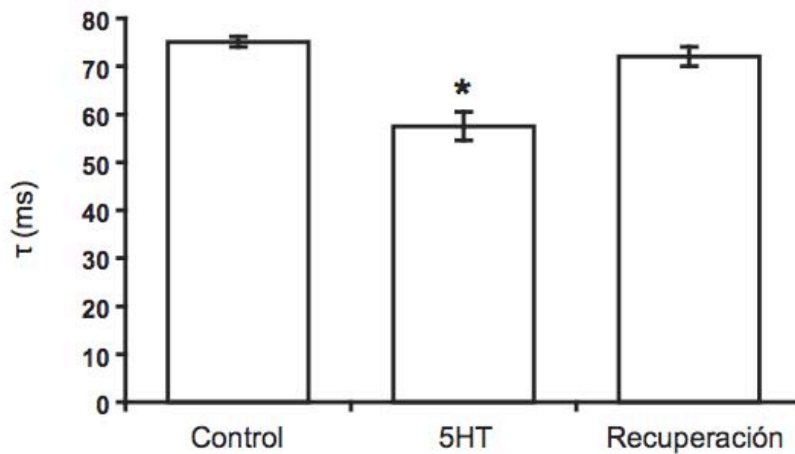


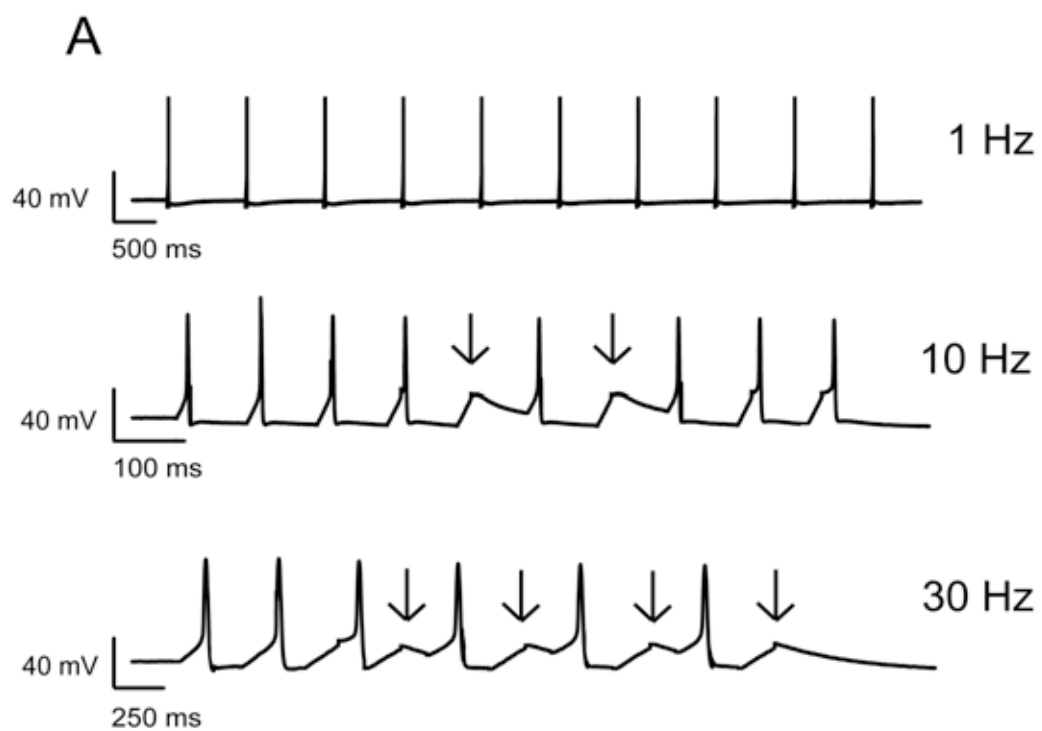
Figura 12.- La serotonina produce una disminución en la resistencia de entrada en neuronas de Retzius. El promedio de la constante de tiempo en 6 neuronas tratadas con reserpina antes (control), durante (5-HT) y después (recuperación) de la aplicación de serotonina por iontoforésis, muestra una disminución reversible durante la aplicación de pulsos iontoforéticos de serotonina. El asterisco muestra una diferencia significativa con respecto al control.

Relación entre la frecuencia de estimulación y la excitabilidad en neuronas de Retzius

Para estudiar el efecto de la serotonina liberada por las neuronas de Retzius en su propia excitabilidad, se estimularon neuronas con pulsos intracelulares de corriente de la amplitud mínima necesaria para producir un potencial de acción en respuesta a cada pulso de corriente cuando se estimulaba a una frecuencia de 1Hz. Con esa misma amplitud de corriente se estimuló a la neurona a frecuencias de 10 y 30 Hz y se analizó la excitabilidad de las neuronas cuantificando el número de potenciales de acción y el número de fallas, es decir cuando no se produjo un potencial de acción en respuesta a un pulso de corriente.

Las neuronas estimuladas con este protocolo mostraron un aumento en el número de fallas proporcional al aumento de la frecuencia de estimulación (Figura 13A). Ante la estimulación a 10 Hz hubo un $23\% \pm 6\%$ de fallas en los

trenes de estimulación, y el porcentaje de fallas se incrementó a $47\% \pm 2\%$ con la estimulación a 30 Hz (n=6).



B

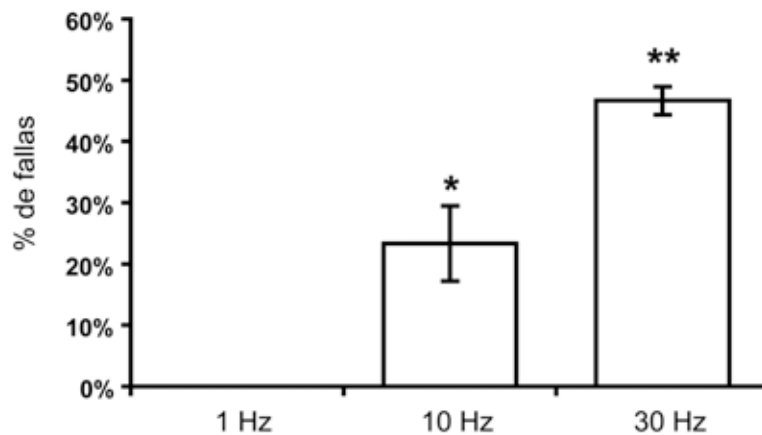


Figura 13. La excitabilidad de las neuronas de Retzius disminuye al aumentar la frecuencia de estimulación.

A) Registros representativos de una neurona estimulada con 10 pulsos de corriente de 4 nA a 1 Hz (trazo superior), 10 Hz (trazo intermedio) y 30 Hz (trazo inferior) con la corriente mínima necesaria para producir un potencial de acción en respuesta a cada pulso de corriente a 1 Hz. A altas frecuencias hay fallas en los potenciales de acción (indicadas con flechas) durante la estimulación.

B) El promedio del porcentaje de fallas de 6 neuronas aumentó de manera proporcional al aumento de la frecuencia de estimulación. Un asterisco indica una diferencia significativa con respecto a la estimulación a 1 Hz. Dos asteriscos indican diferencias significativas con respecto a 1 y a 10 Hz.

La reducción de la excitabilidad de las neuronas de Retzius se debe a la liberación de serotonina

Dado que la liberación de serotonina se incrementa con la frecuencia de estimulación (Stewart, *et al.*, 1989; Trueta, *et al.*, 2003a; Trueta, 2003b; Trueta y De-Miguel en preparación), la disminución de la excitabilidad proporcional a la frecuencia de estimulación podría ser producida por el incremento en la liberación de serotonina. Sin embargo, la ocurrencia de fallas durante trenes de estimulación a frecuencias crecientes puede también deberse al menos en parte al periodo refractario de las neuronas. Para descartar esta posibilidad y estudiar de manera directa si las fallas que ocurren a frecuencias de estimulación altas eran producidas por la serotonina liberada por las propias neuronas en respuesta a la estimulación, bloqueamos las respuestas a la

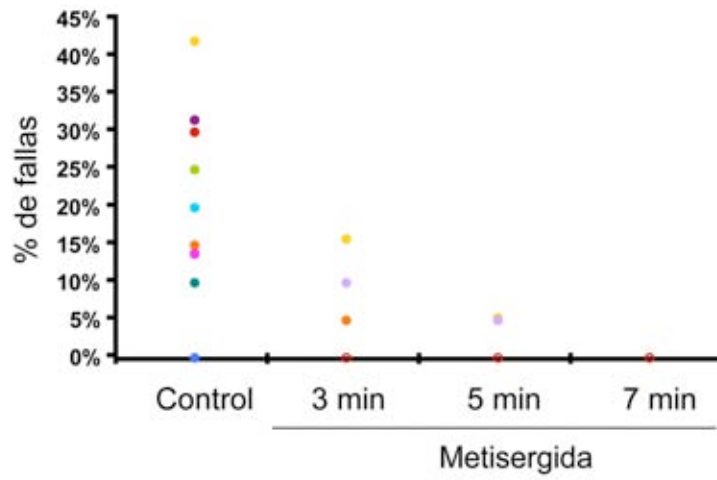
serotonina utilizando metisergida, un antagonista poco selectivo de los receptores de serotonina y analizamos las fallas que se producían ante la estimulación a 10 Hz, por ser una frecuencia a la que se produjo un número intermedio de fallas.

Antes de la aplicación de metisergida, se observó un $22\% \pm 2\%$ de fallas durante los trenes de estimulación, como se había mostrado anteriormente. Después de la aplicación de metisergida en el baño desaparecieron las fallas en todas las neuronas registradas ($n=17$) a pesar de que el tiempo necesario para que las fallas desaparecieran por completo varió entre las diferentes células. En todos los casos, siete minutos después de la aplicación de la metisergida no se observó ninguna falla (Figura 14 A,C).

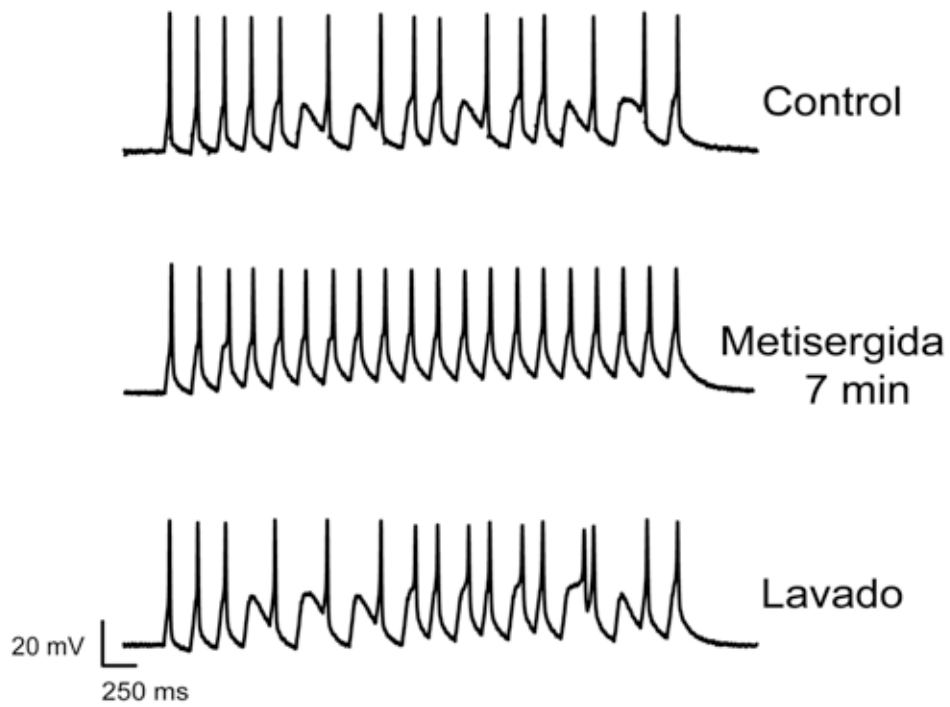
En algunos experimentos, después de observar la desaparición de las fallas, se pudo lavar la metisergida por perfusión con solución fisiológica y se observó una recuperación del 80% en la proporción original de fallas ($n=6$; Figura 14B trazo inferior, C).

Estos resultados sugieren que la disminución en la excitabilidad observada cuando se estimulan las neuronas a frecuencias altas es producida por la serotonina que liberan las propias neuronas, y no a su periodo refractario.

A



B



C

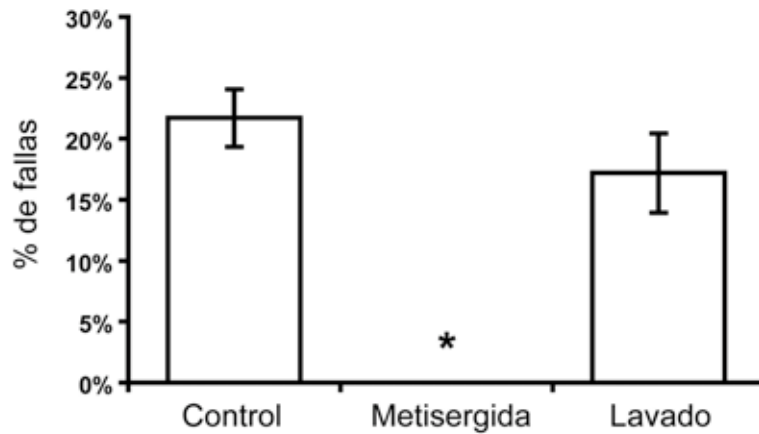


Figura 14 .- La fallas de los potenciales de acción en neuronas de Retzius durante la estimulación a 10 Hz son producidos por la serotonina liberada de las propias neuronas.

A) Neuronas registradas con un microelectrodo lleno de KAc y estimuladas con trenes de pulsos despolarizantes de corriente a 10 Hz (control) mostraron un porcentaje variable de fallas. Registros realizados 3, 5 y 7 minutos después de agregar metisergida en el medio extracelular mostraron una disminución progresiva en el número de fallas durante el tren.

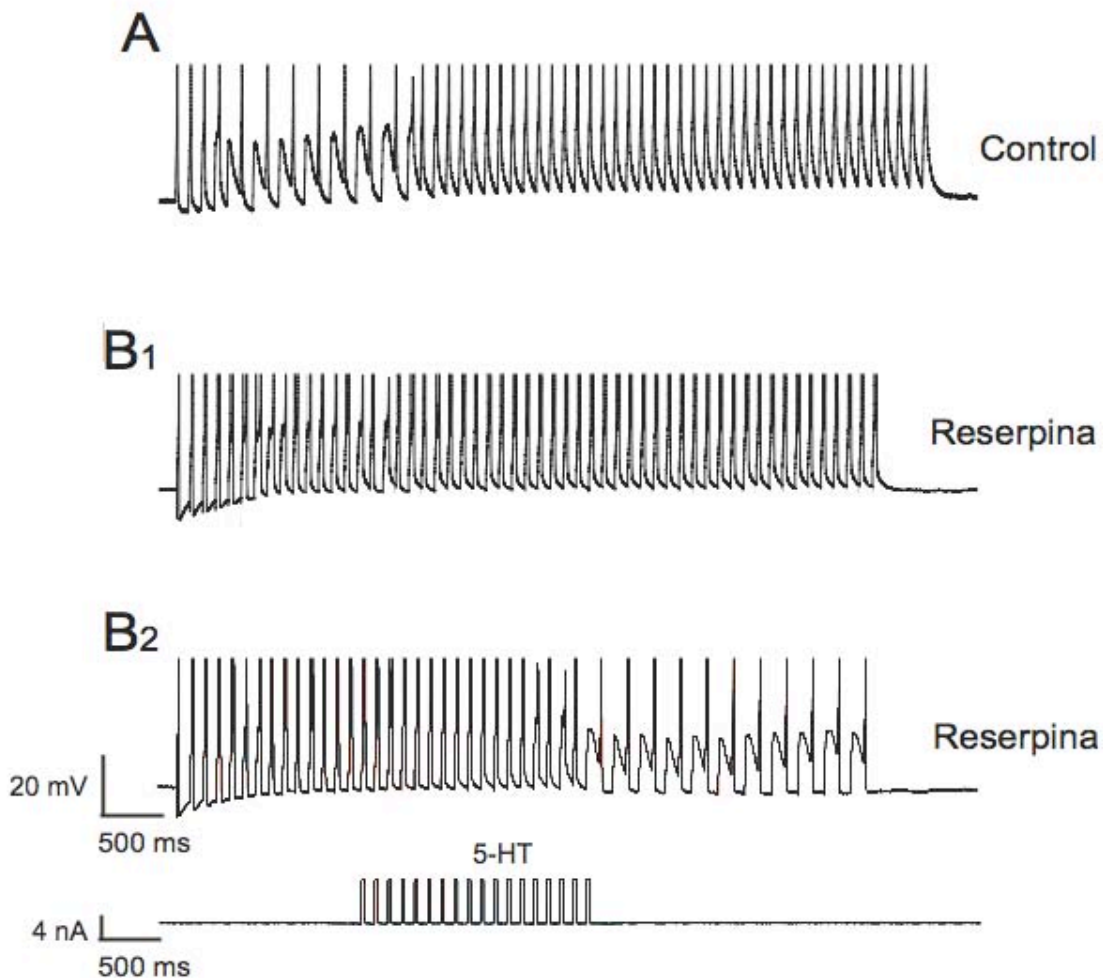
B) Registros representativos de una neurona estimulada a 10 Hz con un microelectrodo lleno de KAc. En condiciones control se observan fallas a lo largo del tren (trazo superior). 7 minutos después de la aplicación de metisergida no se observaron fallas (trazo intermedio). Después de perfundir con una solución fisiológica normal y lavar la metisergida, nuevamente se observaron fallas a lo largo del tren (trazo inferior).

C) Promedio del porcentaje de fallas antes (control) y 7 minutos después de la aplicación de metisergida, así como después de lavar el antagonista (n=6). El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

Además, como experimento alterno para determinar el papel de la serotonina liberada por las neuronas de Retzius en la reducción de su excitabilidad, se analizó la excitabilidad en neuronas tratadas con reserpina. Estas neuronas presentaron un porcentaje de fallas en respuesta a la estimulación ($5\% \pm 4\%$) significativamente menor que las neuronas sin tratamiento ($23\% \pm 6\%$) (Figura 15B, D), apoyando la hipótesis de que la liberación de serotonina es la responsable de la disminución de la excitabilidad que ocurre al estimular las neuronas a frecuencias altas.

Cuando se aplicaron trenes de pulsos iontoforéticos de serotonina simultáneamente con los trenes de pulsos de corriente intracelular, las neuronas tratadas con reserpina presentaron un $35\% \pm 3\%$ de fallas (Figura 15B₂, C), que desaparecieron por completo aproximadamente 2 segundos después de detener la aplicación de serotonina (no se muestran los datos).

Como control negativo se aplicaron pulsos de corriente negativa a la pipeta de serotonina. En estos casos las neuronas tratadas con reserpina no presentaron fallas (no se muestran los datos). Posteriormente a las mismas neuronas se les aplicaron pulsos iontoforéticos (positivos) de serotonina y nuevamente se produjeron fallas ($25\% \pm 7\%$; n=3).



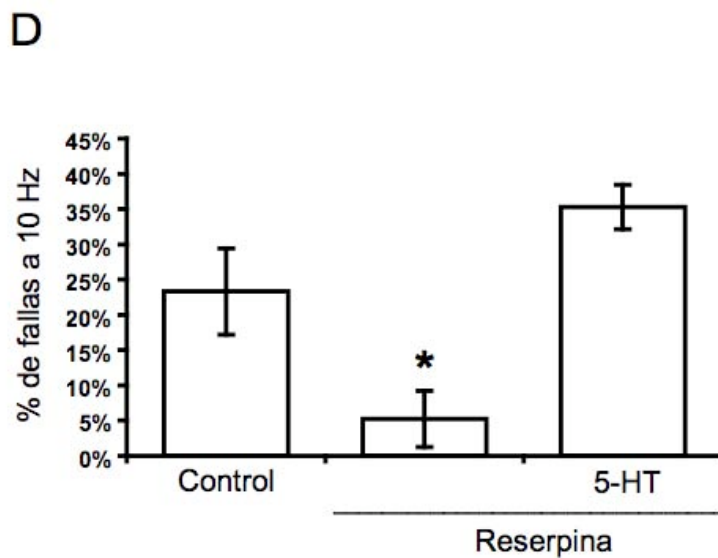
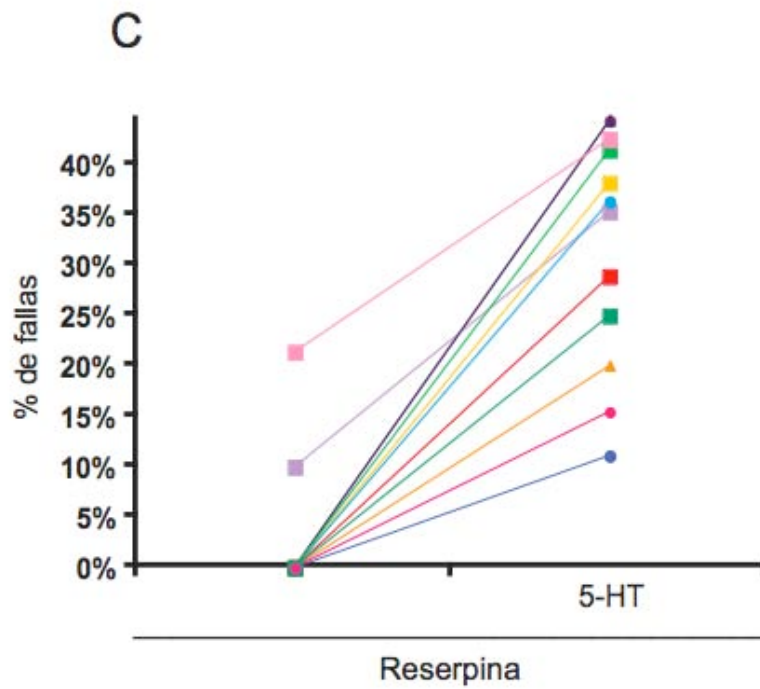


Figura 15.- Las neuronas tratadas con reserpina no muestran fallas en los potenciales de acción durante un tren de impulsos. A) y B) Registros representativos de neuronas registradas con microelectrodos llenos de KAc y estimuladas con un tren de pulsos de corriente a 10 Hz. A) Neuronas control muestran fallas en los potenciales de acción. B₁) Neuronas tratadas con reserpina no muestran fallas durante el tren. B₂) La aplicación de serotonina por iontoforéisis a la misma neurona mostrada en B₁) produjo fallas. Los pulsos iontoforéticos (trazo inferior) fueron

aplicados de manera sincronizada con los pulsos de corriente intracelular.

C) Porcentaje de fallas en 11 neuronas tratadas con reserpina. Cada línea une los puntos correspondientes a la misma célula antes y después de la aplicación iontoforética de serotonina. Los símbolos indican diferentes frecuencias de estimulación: ▲ 1 Hz, ● 5 Hz, ■ 10Hz.

D) Promedio del porcentaje de fallas a 10 Hz en 6 células sin tratamiento y en 6 células tratadas con reserpina antes y durante la aplicación de pulsos iontoforéticos de serotonina. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa.

En 3 neuronas tratadas con reserpina se cuantificó además el número de potenciales de acción que disparó la neurona en respuesta a la aplicación de un pulso largo de corriente intracelular de 300 ms. El número de impulsos disminuyó cuando se aplicó serotonina por iontoforesis simultáneamente con el pulso de corriente intracelular (Figura 16), lo cual apoya la idea de que la serotonina disminuye la excitabilidad neuronal.

Todos estos resultados muestran que la disminución en la excitabilidad observada al estimular a frecuencias altas es debida a la liberación de serotonina por las propias neuronas y apoyan la hipótesis de que la serotonina liberada por las neuronas de Retzius tiene un efecto de autoinhibición de la excitabilidad neuronal. Dado que la liberación de serotonina depende de la frecuencia de disparo, es de esperarse que esta reducción de la excitabilidad disminuya a su vez la liberación de serotonina y de esta manera la liberación produciría una retroalimentación negativa sobre sí misma.

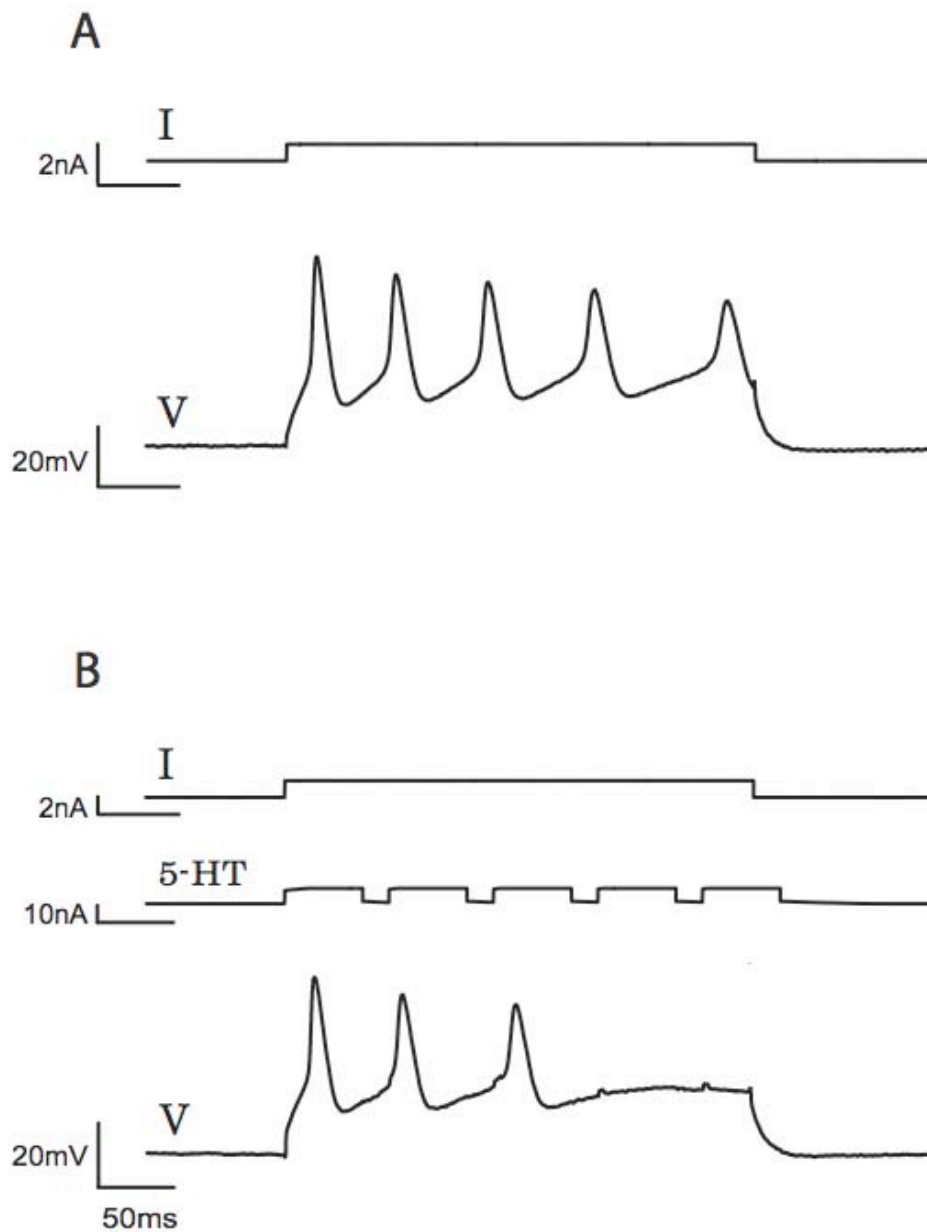


Figura 16.- La serotonina disminuye el número de potenciales de acción que se producen al aplicar un pulso largo de corriente intracelular.

A) Registro representativo de una neurona estimulada con un pulso de corriente intracelular con una duración de 300 ms. La neurona disparó 5 potenciales de acción durante el pulso.

B) Al aplicar pulsos iontoforéticos de serotonina simultáneamente con el pulso de corriente intracelular, se observaron solamente 3 potenciales de acción.

Autorregulación de la liberación de serotonina en las terminales sinápticas

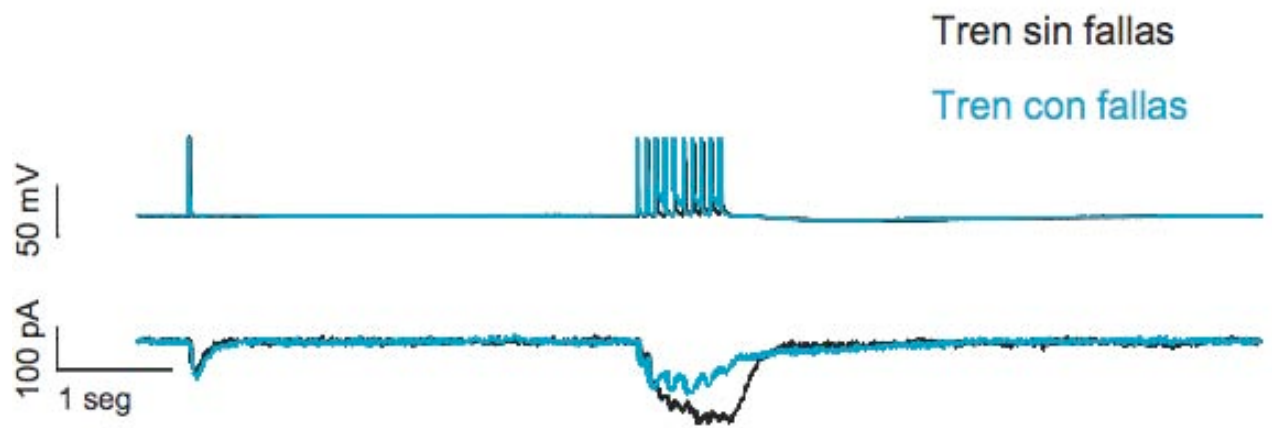
Para estudiar la posibilidad de que la liberación de serotonina en respuesta a la activación de las neuronas a altas frecuencias ejerza una retroalimentación negativa sobre si misma, se analizó la liberación sináptica de serotonina en sinapsis formadas entre neuronas de Retzius y células P en cultivo. En esta preparación la neurona de Retzius es presináptica y la liberación sináptica de serotonina se puede cuantificar a partir de la respuesta postsináptica registrada en la célula P (Henderson, *et al.*, 1983; Dietzel, *et al.*, 1986)

La neurona de Retzius presináptica se estimuló con trenes de 10 pulsos de corriente a diferentes frecuencias, precedidos por un pulso de prueba, a través de un microelectrodo intracelular lleno con KAc.

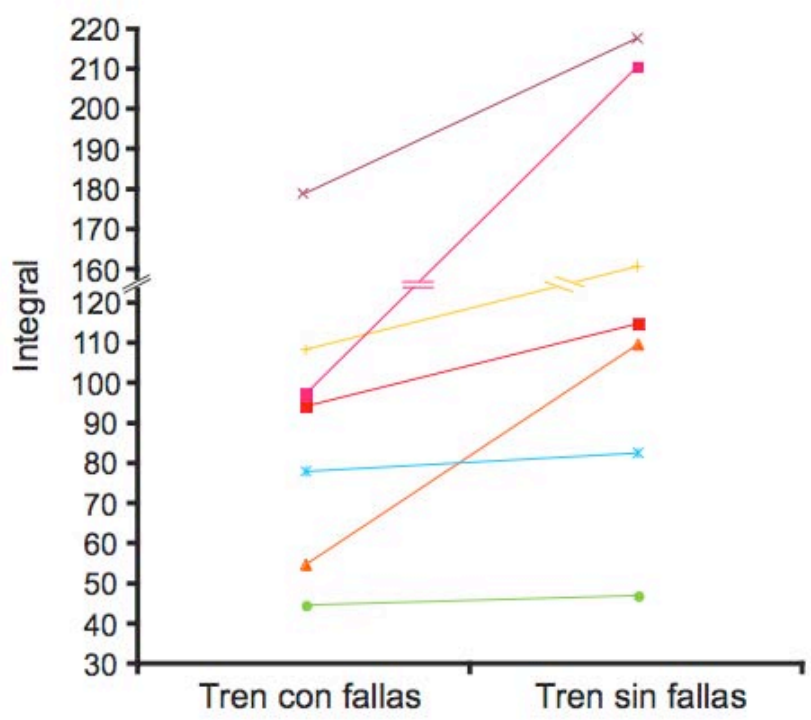
Como se mostró anteriormente, cuando la amplitud de los pulsos despolarizantes se mantiene en un intervalo fisiológico, la serotonina liberada produce una disminución de la excitabilidad en la propia neurona, y se presentan fallas durante los trenes de estimulación (ver Figura 13). Las respuestas sinápticas fueron registradas en estas condiciones y posteriormente se estimuló nuevamente a la neurona presináptica con un tren de pulsos similar, pero incrementando la amplitud de la corriente intracelular para forzar a la neurona a disparar un potencial de acción en respuesta a cada uno de los pulsos de corriente y evitar que se produjeran fallas durante el tren. Se calculó la integral de la corriente postsináptica y el índice de liberación (ver métodos) en respuesta a la estimulación presináptica en ambas condiciones, y se compararon los resultados en presencia y ausencia de fallas presinápticas.

Como era de esperarse, la integral de la corriente postsináptica y el índice de liberación fueron menores en respuesta a los trenes de estimulación en los que ocurrieron fallas que en respuesta a los trenes sin fallas. Esta diferencia ocurrió en todos los casos registrados, sin importar la frecuencia de estimulación (Figura 17B,C). Esto muestra que la liberación de serotonina es muy sensible a los cambios en la excitabilidad neuronal, y sugiere que la serotonina liberada por las neuronas de Retzius ejerce una autoinhibición sobre su propia liberación mediante la reducción de la excitabilidad.

A



B



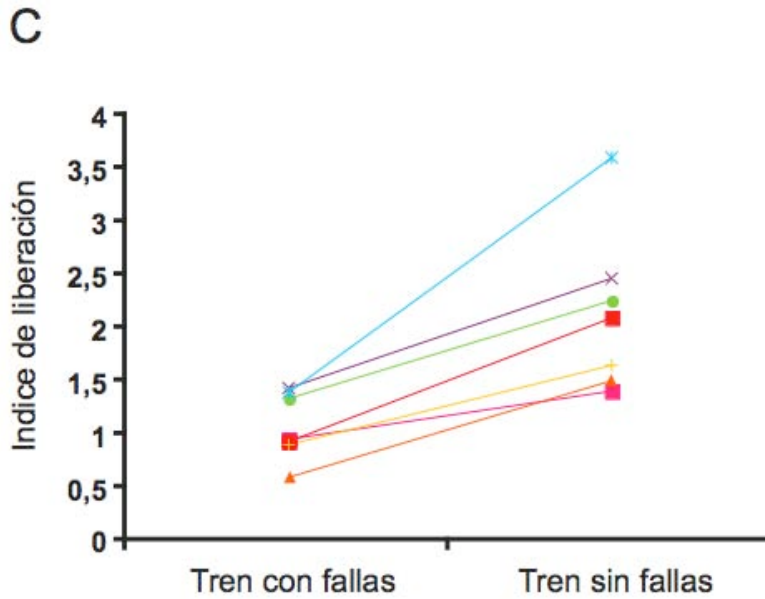


Figura 17.- La liberación sináptica de serotonina en las neuronas de Retzius disminuye por la autoinhibición producida por la serotonina.

A) Trazos representativos de una sinapsis Retzius-P en donde la neurona presináptica (trazo superior) fue estimulada con un tren de 10 pulsos de corriente utilizando un microelectrodo lleno de KAc. Los trazos azules muestran un registro en el que hubo fallas durante el tren debido a la autoinhibición serotoninérgica. El trazo negro muestra un registro subsecuente de la misma neurona estimulada con pulsos de corriente con una amplitud mayor para evitar fallas durante el tren. Las corrientes postsinápticas se muestran en el trazo inferior. B) y C) Integral de la corriente postsináptica, e índice de liberación sináptica en 7 pares de neuronas donde la neurona presináptica fue estimulada con trenes de 10 pulsos de corriente a diferentes frecuencias (indicadas con diferentes símbolos: ▲ 3 Hz, * 7 Hz, + 13 Hz, ■ 30Hz, x 40 Hz, ● 50 Hz), precedidos por un pulso de prueba. Las líneas unen los datos del mismo par de neuronas en respuesta a un tren a la misma frecuencia con y sin fallas presinápticas. En todos los casos, la liberación presináptica de serotonina en presencia de la autoinhibición serotoninérgica (con fallas) fue menor que la transmisión en ausencia de fallas.

La liberación de serotonina de las terminales presinápticas tiene una fuerte dependencia del potencial de membrana (Dietzel, *et al.*, 1986). Por ello, el curso temporal de los cambios en el potencial de membrana presináptico puede determinar el curso temporal de la liberación y por lo tanto determinar al menos en parte la cinética de las corrientes postsinápticas. Es probable entonces que la hiperpolarización post-estimulación que produce la serotonina

liberada por las neuronas de Retzius no sólo disminuya la excitabilidad en el tiempo subsecuente, sino también haga que en ese momento se detenga la liberación de serotonina antes de lo que se detendría en ausencia de la autorregulación que hemos mostrado. Esto se vería reflejado en un acortamiento en la cinética de caída de las corrientes postsinápticas. Para estudiar esta posibilidad, medimos la duración de la fase de caída de las corrientes postsinápticas en respuesta a trenes de 10 pulsos con y sin fallas en los potenciales de acción presinápticos. Como se muestra en la figura 18, en todos los casos las corrientes sinápticas en respuesta a los trenes con fallas, en los que la liberación de serotonina fue disminuida por la autorregulación, tuvieron una fase de caída más larga que las corrientes sinápticas en respuesta a los trenes sin fallas, en los que se liberó más serotonina. Esto sugiere que la hiperpolarización presináptica que produce la serotonina detiene la liberación rápidamente al final del tren de impulsos, lo que produce un acortamiento en la fase de caída de las corrientes postsinápticas.

El alargamiento de la fase de caída de la corriente postsináptica en respuesta a los trenes con fallas podría explicarse como la consecuencia de una liberación más prolongada de serotonina en respuesta a una repolarización más lenta de la membrana presináptica cuando la hiperpolarización producida por la autoinhibición serotoninérgica está ausente. Esto implica que las despolarizaciones subumbrales sean capaces de producir la liberación de serotonina. De manera consistente con esta hipótesis, la fase de caída de las corrientes postsinápticas en respuesta a un potencial de acción o a trenes de impulsos en neuronas presinápticas que presentaron una despolarización después de la estimulación por tener el gradiente transmembranal de cloro invertido, fueron mucho más largas (690.850 ± 110.485 y 4318.466 ± 360.196 ms para 1 y 10 impulsos respectivamente) que aquellas en que la neurona presináptica se estimuló con un microelectrodo lleno de KAc (391.510 ± 38.438 ms y 1243.891 ± 152.597 ms respectivamente; figura 19). Esto demuestra que las despolarizaciones subumbrales son capaces de producir la liberación de serotonina, y apoya la hipótesis de que la hiperpolarización producida por la serotonina en la neurona presináptica detiene esta liberación, haciendo más corta la fase de caída de la corriente sináptica.

Dado que sabemos que la sensibilidad de la membrana postsináptica a la serotonina permanece constante durante la aplicación continua de serotonina por más de un segundo (Trueta, *et al.*, 2003a), podemos suponer que estos cambios se deben a un cambio en el curso temporal de la liberación presináptica de serotonina.

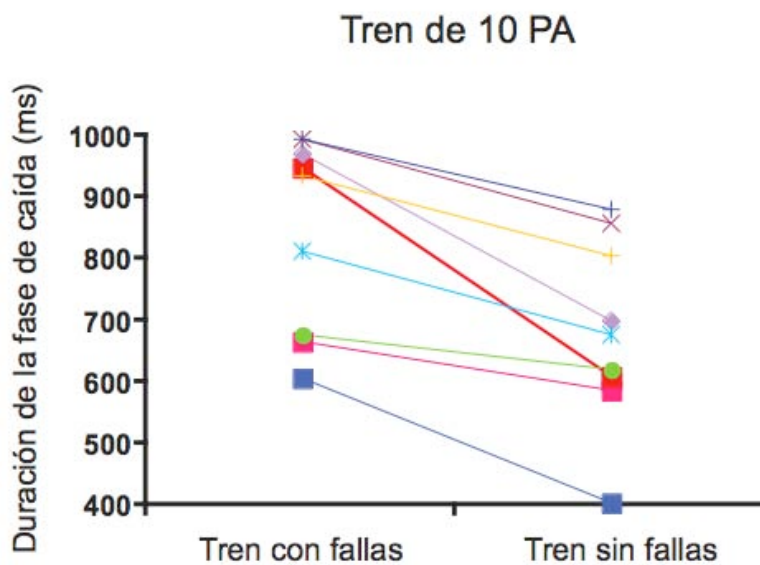


Figura 18. El curso temporal de la liberación de serotonina es regulado por la serotonina liberada por las propias neuronas de Retzius.

Duración de la fase de caída calculada en 9 pares de neuronas Retzius-P donde la neurona presináptica fue estimulada con trenes de 10 pulsos de corriente a diferentes frecuencias (indicadas con diferentes símbolos: *7 Hz, + 13 Hz, ■30Hz, × 40 Hz, ●50 Hz), precedidos por un pulso de prueba. Las líneas unen los datos del mismo par de neuronas en respuesta a un tren a la misma frecuencia con y sin fallas presinápticas. En todos los casos, la duración de la fase de caída de la corriente sináptica fue mayor cuando la autoinhibición disminuyó la liberación de serotonina (trenes con fallas).

Estos resultados muestran que la serotonina además de regular la cantidad de liberación al modular la excitabilidad, puede regular el curso temporal de la liberación mediante la modulación del potencial de membrana presináptico.

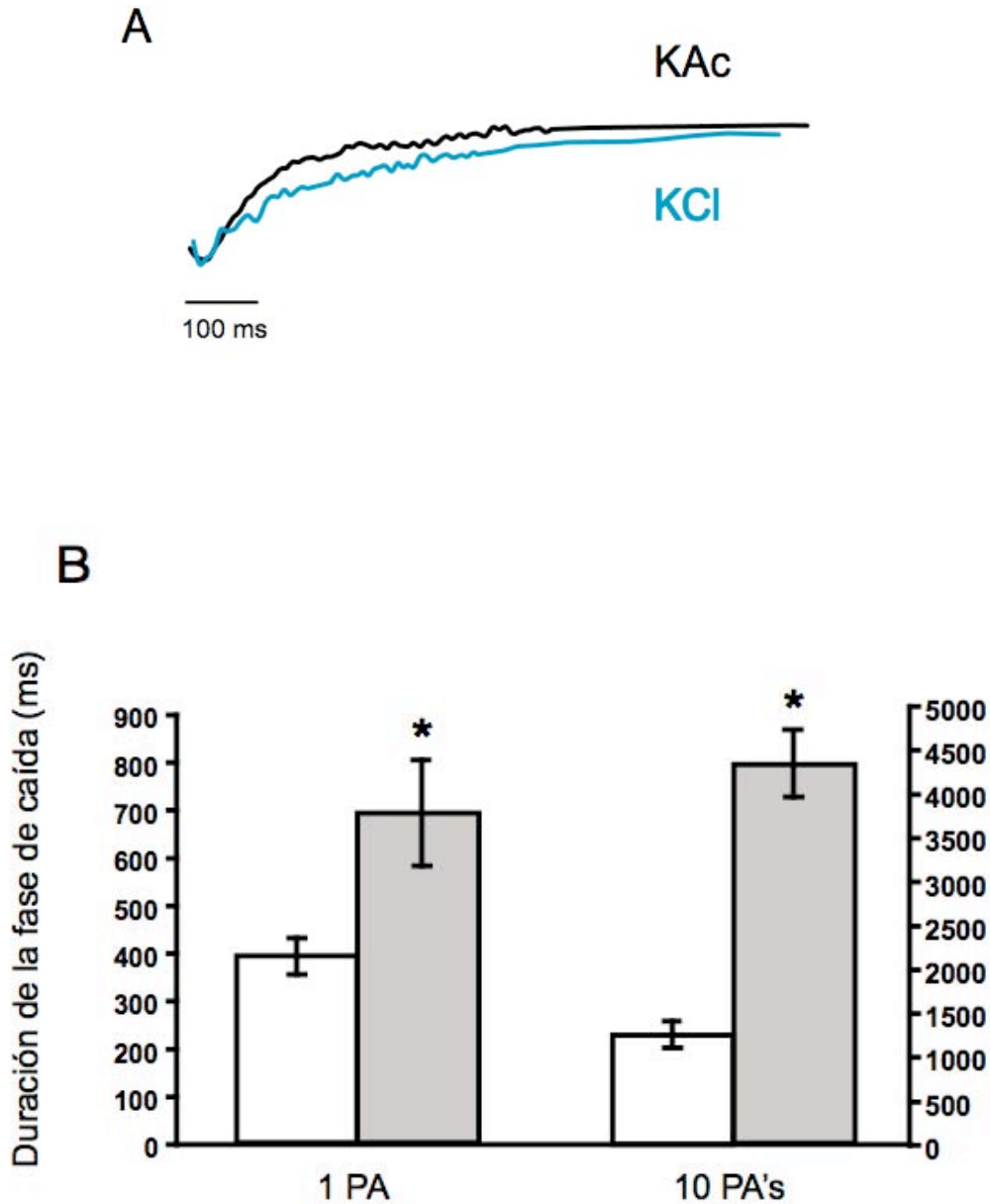


Figura 19. Las despolarizaciones subumbrales producen la liberación de serotonina.

A) Fase de caída de la corriente postsináptica registrada en células P en respuesta a la estimulación de la neurona de Retzius presináptica con un microelectrodo lleno de KAc (trazo negro) o lleno de KCl (trazo azul). La neurona presináptica disparó 10 impulsos a 10 Hz en los dos casos. La amplitud de las corrientes está normalizada para sobreponer los picos de las corrientes.

B) Promedio de la duración de la fase de caída de la corriente sináptica en respuesta a un potencial de acción presináptico (eje izquierdo; n=10) o a un tren de 10 potenciales de acción presinápticos (eje derecho), producidos mediante la estimulación con un microelectrodo lleno de KAc (barras blancas) o de KCl (barras grises; n=12). La duración de la fase de caída de la corriente sináptica fue mayor cuando se invirtió el gradiente transmembranal de cloro en la neurona presináptica. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la estimulación con KAc.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que las neuronas de Retzius presentan un mecanismo de autoinhibición por medio del cual la serotonina liberada ante la actividad a altas frecuencias ocasiona una disminución en la excitabilidad de las propias neuronas y en su propia liberación. Este mecanismo se activa rápidamente después del inicio de la liberación de serotonina, y tiene un efecto inmediato sobre la liberación subsecuente.

La estimulación de las neuronas de Retzius en cultivo a altas frecuencias produjo una hiperpolarización después del disparo de un tren de impulsos. De manera consistente, en condiciones de fijación de voltaje, se registró una corriente saliente después del tren de pulsos despolarizantes. Estas respuestas post-estimulación se invirtieron al invertir el gradiente transmembranal de cloro mediante la inyección de cloruro a la neurona, lo que sugiere que son producidas por la activación de corrientes de cloro. La respuesta post-estimulación se abolió en ausencia de calcio extracelular, así como en neuronas a la que se les vació la reserva de serotonina, lo cual sustenta que la respuesta post-estimulación es producida por la serotonina liberada por las propias neuronas. Para estudiar esta dependencia, los experimentos se realizaron invirtiendo el gradiente transmembranal de cloro, ya que en estas condiciones las respuestas en voltaje se invierten y se amplifican, permitiendo una manipulación más sencilla de su amplitud (Fuchs, *et al.*, 1982). En contraste, en condiciones fisiológicas no se observó un cambio evidente al bloquear la secreción, posiblemente debido a que el potencial de equilibrio del cloro es muy cercano al potencial de reposo, lo cual hace que la respuestas post-estimulación producidas por corrientes de cloro sean muy pequeñas y su amplitud sea difícil de modular.

Al bloquear la liberación sustituyendo el calcio extracelular por magnesio, no sólo se abolió la despolarización observada en las neuronas control después de la estimulación, sino que se presentó una pequeña hiperpolarización. Esto puede deberse a que las neuronas de Retzius muestran corrientes rectificantes de potasio que contribuyen a la repolarización del

potencial de acción así como a la hiperpolarización post-potencial (Stewart, *et al.*, 1989). El efecto de estas corrientes de potasio se hizo evidente cuando se bloqueó la despolarización producida por la serotonina en neuronas con el gradiente de cloro invertido.

Las neuronas de Retzius mostraron una disminución en la excitabilidad cuando fueron estimuladas a altas frecuencias, que fue revelada por la aparición de fallas en la generación de potenciales de acción en respuesta a algunos de los pulsos de corriente durante un tren de estimulación. La amplitud de los pulsos de corriente era suficiente para producir un potencial de acción sin estimulación previa. Sin embargo, después del disparo de unos cuantos potenciales de acción a alta frecuencia, que presumiblemente producen la liberación de serotonina, la misma corriente fue insuficiente para llevar a la neurona al umbral de disparo. Dicha disminución en la excitabilidad se abolió al aplicar un antagonista poco selectivo de los receptores de serotonina (metisergida) y no se observó en neuronas tratadas con reserpina, lo cual apoya la hipótesis de que la disminución de la excitabilidad es producida por la serotonina liberada por las propias neuronas.

Algunos de los receptores a serotonina en las neuronas de sanguijuela son farmacológicamente distintos de los conocidos en vertebrados. Por ejemplo, las neuronas de Retzius y las neuronas P, presentan un receptor ionotrópico que activa una conductancia de cloro (Henderson, 1983; Liu y Nicholls, 1989; Lessman y Dietzel, 1995). En las células P hay además un receptor metabotrópico acoplado a la producción de AMP cíclico y a la activación de la cinasa de proteínas tipo A, que también activa una conductancia de cloro (Sanchez-Armass, *et al.*, 1991). Además de estos dos tipos de receptores, cuya farmacología es distinta de los receptores conocidos en vertebrados, las células P presentan receptores extrasinápticos de tipo 5-HT₂, que activan pequeñas conductancias catiónicas monovalentes (Drapeau y Sánchez-Armass, 1988; Drapeau, *et al.*, 1989). Como la mayor parte de las herramientas farmacológicas disponibles para receptores de vertebrados no son efectivas en estas neuronas y no se sabe cuáles de los receptores presentes en éstas son autorreceptores, es difícil bloquear selectivamente a los

autorreceptores sin bloquear los receptores postsinápticos. Por tal motivo, para evitar el efecto de la autoinhibición sobre la excitabilidad presináptica y poder estudiar su papel en la transmisión sináptica, utilizamos una estrategia diferente, que consistió en forzar el disparo de las neuronas aumentando la corriente de estimulación para sobrepasar el efecto autoinhibidor de la serotonina. Como era de esperarse, en estas condiciones la liberación sináptica fue siempre mayor que en presencia del efecto inhibitor de la serotonina sobre la excitabilidad neuronal, lo cual muestra que la liberación de serotonina es muy sensible a los cambios en la excitabilidad neuronal y sugiere que la serotonina ejerce una autoinhibición sobre su propia liberación a través de la disminución de la excitabilidad de las neuronas serotoninérgicas.

Además de la disminución de la cantidad de liberación producida por la disminución de la excitabilidad, la serotonina afectó el curso temporal de su propia liberación. Cuando las neuronas se estimulan con una amplitud de corriente suficiente para asegurar que se alcance el umbral de disparo en todos los pulsos de un tren a alta frecuencia, se produce una liberación masiva de serotonina (Trueta, *et al.*, 2003a, Trueta, 2003b; Trueta y De-Miguel en preparación). En estas condiciones, la duración de la fase de caída de las corrientes sinápticas fue significativamente menor que cuando la autoinhibición serotoninérgica disminuyó la cantidad de serotonina liberada. Esto sugiere que la hiperpolarización que produce la serotonina en las neuronas de Retzius detiene la liberación de manera rápida, disminuyendo el tiempo de caída de las corrientes sinápticas. El alargamiento de la corriente postsináptica que se presentó en condiciones fisiológicas, cuando la serotonina redujo la excitabilidad y la subsecuente liberación, se podría explicar por la ausencia de esta hiperpolarización después de los pulsos subsecuentes, que no producen una liberación suficiente para activar una hiperpolarización post-estimulación. Aunque no se alcanza el umbral de disparo, estos pulsos de corriente producen una despolarización sub-umbral pasiva. A pesar de que no realizamos un análisis detallado de la cinética del potencial de membrana presináptico en estas condiciones, cabe suponer que en ausencia de potenciales de acción y de la consecuente liberación de serotonina, el potencial de membrana

presináptico regresa al potencial de reposo más lentamente después de una despolarización sub-umbral, ya que la cinética del cambio de voltaje en esas condiciones es determinada únicamente por las propiedades pasivas de la membrana. Esta repolarización lenta podría permitir la liberación de cantidades pequeñas de serotonina durante un tiempo más prolongado que cuando hay una hiperpolarización rápida que detiene súbitamente la liberación. De hecho, las neuronas de Retzius liberan serotonina incluso con despolarizaciones graduadas sub-umbrales (Dietzel, *et al.*, 1986). Esto fue comprobado en nuestros experimentos con KCl en el microelectrodo presináptico, en los que la despolarización presináptica que ocurrió después de la estimulación con un tren de impulsos produjo un alargamiento muy importante del potencial sináptico, mostrando que la neurona de Retzius continúa liberando serotonina incluso durante una despolarización sub-umbral. En resumen, en condiciones fisiológicas, donde la serotonina reduce la excitabilidad y la neurona presináptica presenta fallas durante los trenes de estimulación, la consecuente disminución en la liberación de serotonina hace que después de los pulsos subsecuentes no ocurra una hiperpolarización post-potencial y que el potencial de membrana presináptico regrese al potencial de reposo más lentamente, lo cual permite que se siga liberando serotonina en pequeñas cantidades, pero por un tiempo mayor, alargando la fase de caída de la corriente postsináptica. El resultado final en respuesta a un tren de estimulación con estas características es una corriente sináptica de menor amplitud y más lenta.

A pesar del alargamiento en la cinética de la corriente postsináptica, su integral y el índice de liberación fueron menores cuando la serotonina produjo la autoinhibición sobre las neuronas presinápticas que cuando no ocurrió la autoinhibición, es decir, el efecto neto de la autoinhibición es una reducción en la cantidad total de serotonina liberada. Sin embargo, el alargamiento del curso temporal de la corriente postsináptica podría tener implicaciones sobre la propagación de los potenciales sinápticos en las dendritas de una neurona postsináptica, ya que los potenciales sinápticos lentos son filtrados en un grado menor por las propiedades pasivas de la membrana que los rápidos. Esto podría

entonces tener implicaciones en la contribución que tendrían estos potenciales sinápticos a la excitación de la neurona postsináptica durante su integración.

El efecto de autoinhibición sobre la excitabilidad de las neuronas de Retzius fue evidente únicamente cuando las neuronas se estimularon a frecuencias altas, que producen una liberación grande de serotonina. Sin embargo, el análisis de la cinética de las corrientes sinápticas mostró que la liberación de serotonina en respuesta a un solo potencial de acción también se alarga cuando se invierte el gradiente transmembranal de cloro en la neurona presináptica. Esto sugiere que la serotonina liberada en respuesta a un solo potencial de acción es de hecho sensada por los autorreceptores. Para producir un cambio evidente en la excitabilidad neuronal en respuesta a pulsos de corriente supra-umbrales como los que utilizamos, se requiere de la activación de un número mayor de autorreceptores, pero es posible que en condiciones fisiológicas en que la actividad eléctrica es determinada por la integración de potenciales sinápticos sub-umbrales, la serotonina liberada incluso ante el disparo a bajas frecuencias tenga una contribución a la regulación de dicha actividad.

Estudios realizados con neuronas serotoninérgicas en langostas (Heinrich, *et al.*, 1999) y sanguijuelas (Gocht y Heinrich, 2007; Tobias, *et al.*, 2006; Rose, *et al.*, 2006), mostraron que después de una estimulación prolongada ocurre un periodo de autoinhibición en el que las neuronas dejan de disparar después de una estimulación prolongada. Dado que en dichos estudios la autoinhibición persistió en neuronas en que se vació la reserva de serotonina por inyecciones repetidas de 5,7-dihidroxitriptamina, se llegó a la conclusión que la autoinhibición no dependía de la liberación de serotonina, sino que era producida por cambios en las propiedades intrínsecas de la membrana. El fenómeno que mostramos en este trabajo es distinto al reportado por los citados autores, ya que ocurre en tiempos cortos después del inicio de la estimulación y liberación de serotonina, mientras que el fenómeno de autoinhibición reportado en los trabajos antes mencionados ocurrió después de un periodo de despolarización mediante la inyección de corriente directa

sostenida que forzó a las neuronas a disparar por varias centenas de milisegundos. Es posible que el fenómeno de autoinhibición que mostramos en este trabajo fue enmascarado en los citados experimentos, en los que la estimulación fue muy distinta de la que reciben las neuronas en condiciones fisiológicas y muy posiblemente sobrepasó el mecanismo rápido de autoinhibición mostrado aquí de la misma manera que en nuestros experimentos para estudiar la transmisión sináptica, donde incrementamos la amplitud de la corriente de estimulación para forzar el disparo de las neuronas.

Los experimentos que mostramos fueron realizados en neuronas aisladas en cultivo. En registros de neuronas *in situ* dentro de los ganglios nerviosos, no observamos la inversión de la respuesta post-estimulación que mostramos en cultivo al invertir el gradiente transmembranal de cloro. Esto sugiere que el mecanismo de autoinhibición que reportamos aquí es un mecanismo sináptico. En las neuronas dentro del ganglio, las terminales sinápticas se encuentran lejos del sitio de registro, lo que podría explicar que no sea evidente el efecto de la serotonina sobre la propia neurona de Retzius. Es posible que al estimular en el soma los primeros potenciales de acción que se producen allí lleguen a la terminal sináptica, produciendo la liberación de serotonina y la activación de autorreceptores, y esto afecte la excitabilidad local, haciendo que los potenciales de acción subsecuentes no lleguen a la terminal y se produzcan fallas locales que no se registraron en el soma. Si la autoinhibición que reportamos fuera producida por la liberación somática de serotonina actuando sobre autorreceptores somáticos, posiblemente sería evidente también en neuronas *in situ*. En condiciones de cultivo las neuronas son prácticamente isopotenciales y esto elimina la propagación electrónica aumentando la resolución de los eventos sinápticos. Otra posibilidad es que en cultivo el muñon de la neurona puede formar sinapsis sobre sí mismo, es decir, formar autapsis (Kuffler, *et al.*, 1987). Es posible que la formación de autapsis en las neuronas de Retzius haga más evidente el efecto que produce la serotonina en las propias neuronas.

La regulación de la frecuencia de disparo se lleva a cabo mediante la integración de los potenciales sinápticos que reciben las neuronas. Las neuronas de Retzius tienen un proceso de integración muy fino, que es regulado en parte por la sinapsis eléctrica que acopla las dos neuronas de Retzius en el ganglio (De-Miguel, *et al.*, 2001). Las neuronas de Retzius reciben entradas sinápticas químicas en las dendritas acopladas eléctricamente, provenientes de neuronas aún sin identificar, que producen el disparo a bajas frecuencias. Además, en las neuritas no acopladas reciben información de las neuronas mecanosensoriales, cuya activación produce el disparo a frecuencias altas (Velázquez-Ulloa, *et al.*, 2003). El mecanismo de autoinhibición que mostramos en este trabajo podría contribuir sobre todo a la regulación de la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas una vez que comienzan a disparar a frecuencias altas por la activación de las neuronas mecanosensoriales. Sin embargo, dado que el efecto sobre los autorreceptores es inmediato y se activa incluso en respuesta a un solo potencial de acción, podría tener también una contribución menor a la regulación de la integración y/o la actividad eléctrica a bajas frecuencias.

El número de neuronas serotoninérgicas tanto en vertebrados como en invertebrados es pequeño en relación con la cantidad de otros tipos neuronales. Por ejemplo, en los roedores hay únicamente 9,000 neuronas serotoninérgicas (Fuxe, *et al.*, 1994) y en la sanguijuela hay 7 pares en cada ganglio (Lent y Frazer, 1977). A pesar del reducido número de neuronas serotoninérgicas, la serotonina tiene una serie de funciones muy importantes, sobre todo en la conducta (Raleigh, *et al.*, 1991; Kravitz, 2000; McCall y Aghajanian, 1979; Jacobs y Fornal, 1993; White, *et al.*, 1996; Weiger, 1997; Breisch, *et al.*, 1976; Saller y Stricker, 1976; Jacobs y Azmitia, 1992; Hull, *et al.*, 1999; Klein, *et al.*, 1980; Byrne, *et al.*, 1991; Ehrlich, *et al.*, 1992; Sahley, 1994), donde variaciones pequeñas en la cantidad de serotonina pueden tener efectos importantes. Esto sugiere que la función de las neuronas serotoninérgicas debe tener una regulación muy fina. El mecanismo de autoinhibición que mostramos aquí podría participar de manera importante en la regulación de la actividad de estas neuronas una vez que comienzan a disparar a frecuencias altas, evitando una liberación excesiva de neurotransmisor que podría tener efectos adversos

en la conducta o saturar los receptores. Este mecanismo podría también prevenir que se agote la poza de vesículas disponibles, lo que haría que las células dejaran de ser funcionales. El mecanismo de autoinhibición parece entonces ser un mecanismo importante de regulación de la frecuencia de disparo y de la liberación de serotonina.

CONCLUSIONES

La serotonina liberada por las neuronas de Retzius en respuesta a la estimulación eléctrica actúa sobre autorreceptores en las propias neuronas, activando corrientes de cloro que producen una disminución en la resistencia membranal y una hiperpolarización. Esto tiene como consecuencia una disminución en la excitabilidad neuronal y por lo tanto en la propia liberación de serotonina en las terminales sinápticas. Además de regular la cantidad de serotonina liberada, esta autoinhibición regula el curso temporal de la liberación, deteniéndola rápidamente después de la estimulación eléctrica.

REFERENCIAS

- Abi-Dargham, A., Laruelle, M., Wong, D.T., *et al.* (1993). Pharmacological and regional characterisation of [³H]LY278 584 binding sites in human brain. *J. Neurochem.* **60**, 730-737.
- Adell, A., Celada, P., Abellan, M.T., *et al.* (2002). Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev.* **39**, 154-180.
- Adham, N., Borden, L.A., Schechter, L.E., *et al.* (1993) Cell-Specific Coupling of the Cloned Human 5-HT(1F) Receptor to Multiple Signal Transduction Pathways. *Naunyn-Schmied.Arch.Pharmacol.* **348**, 566-575.
- Adham, N., Romanienko, P., Harting, P., *et al.* (1992). The rat 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor is the species homologue of the human 5-hydroxytryptamine_{1D β} receptor. *Mol. Pharmacol.* **41**, 1-7.
- Aghajanian, G.K. (1995). Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. En: Bloom, F.R., Kupfer, D.J. (Eds.), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven, New York. p. 1451-1459.
- Aghajanian, G.K. y Lakoski, J.M. (1984). Hyperpolarization of serotonergic neurons by serotonin and LSD: Studies in brain slices showing increased K⁺ conductance. *Brain Res.* **305**, 181-185.
- Albert, P.R., Lembo, P., Storring, J.M., *et al.* (1996). The 5-HT_{1A} receptor: signaling, desensitization, and gene transcription. *Neuropsychopharmacology.* **14**, 19-25.
- Ali, D.W., Catarsi, S., y Drapeau P. (1998). Ionotropic and metabotropic activation of a neuronal chloride channel by serotonin and dopamine in the leech *Hirudo medicinalis*. *Journal of Physiology.* **509**, 211-219.
- Arango, V., Underwood, M. D. y Mann J. J. (2002) Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. *Progress in Brain Research.* **136**, 443-453.

- Audet, M.A., Descarries, L., Doucet, G. (1989). Quantified regional and laminar distribution of the serotonin innervation in the anterior half of adult rat cerebral cortex. *J. Chem. Neuroanat.* **2**, 29-44.
- Azmitia, E.C. (1981) The visualization and characterization of 5-HT reuptake sites in the rodent and primate hippocampus. A preliminary study. *J. Physiol.* **77**, 175-182.
- Bard, J.A., Zgombick, J., Adham, N., *et al.* (1993). Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **268**, 23422-23426.
- Barnes, N. M y Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* **38**, 1083-1152.
- Baylor, D. A. y Nicholls, J. G. (1971). Patterns of regeneration between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Nature*, Lond. **232**, 268-269.
- Beck, S. G., Bacon, W.L. (1998). 5-HT₇ receptor mediated inhibition of sAHP in CA3 hippocampal pyramidal cells. *Soc. Neurosci. Abstr.* **24**, 435.4
- Benloucif, S., Keega, M.J., Galloway, M.P., (1993). Serotonin-facilitated dopamine realease in vivo-pharmacological characterisation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**, 373-377.
- Blackshaw, S. E., Nicholls, J. G., y Parnas, I. (1988). Physiological responses, receptive fields and terminal arborizations of nociceptive cells in the leech. *Journal of Physiology (London).* **326**, 251-260.
- Blackshaw, S.E., Thompson, S.W. (1988). Hyperpolarizing responses to stretch in sensory neurones innervating leech body wall muscle. *J. Physiol.* **396**, 121-137.

- Blier, P., Piñeyro, G., Mansari, M., *et al.* (1998). Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **15**, 204-216.
- Boess, F.G., Martin, I.L. (1994). Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology.* **33**, 275-317.
- Boess, F.G., Monsma, F.J., Carolo, C., *et al.* (1997). Functional and radioligand binding characterisation of rat 5-HT₆ receptors stably expressed in HEK 293 cells. *Neuropharmacology.* **36**, 713-720.
- Bonhomme, N., De Deurwaerdere, P., Le Moal, M., *et al.* (1995). Evidence for 5-HT₄ receptor subtype involvement in the enhancement of striatal dopamine release induced by serotonin: a microdialysis study in the halothane-anesthetized rat. *Neuropharmacology.* **34**, 269-279.
- Bonvento, G., Scatton, B., Claustre, Y, *et al.* (1992). Effect of local injection of 8-OH-DPAT into the dorsal or median raphe nuclei on extracellular levels of serotonin in serotonergic projection areas in the rat brain. *Neurosci. Lett.* **137**, 101-104.
- Breisch, S.T., Zemlan, F.P. y Hoebel, B.G. (1976) Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science.* **192**, 382-385.
- Brieden, T., Ujeyl, M. y Naber, D. (2002) Psychopharmacological treatment of aggression in schizophrenic patients . *Pharmacopsychiatry.* **35**, 83-89.
- Bruinvels, A.T., Palacios, J.M., Hoyer, D. (1993). Autoradiographic characterisation and localisation of 5-HT_{1D} compared to 5-HT_{1B} binding sites in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **347**, 569-582.
- Bruns, D., Riedel, D., Klingauf, J., *et al.* (2000) Quantal release of serotonin. *Neuron.* **28**, 205-220.

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

-Bufton, K. E., Steward, L. J., Barber, P.C., *et al.* (1993). Distribution and characterisation of the [³H]granisetron-labelled 5-HT₃ receptor in the human forebrain. *Neuropharmacology*. **32**, 1325-1332.

-Bunin, M. A., y Wightman, R.M. (1999). Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of 5-HT. *Trends. Neurosci.* **23**, 58-59.

-Burnet, P.W.J., Eastwood, S.L., Lacey, K., *et al.* (1995). The distribution of 5HT_{1A} and 5HT_{2A} receptor mRNA in human brain. *Brain Res.* **676**, 157-168.

-Burrell, B.D., Sahley, C.L., y 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.

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

-Byrne, J.H., Baxter, D.A., Buonomano, D.V., *et al.* (1991) Neural and molecular bases of nonassociative and associative learning in *Aplysia*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **627**, 124-149.

-Casimir, A., Fornal, W., Joseph Litto., *et al.* (1994). Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} agonist and antagonist drug administration in behaving cats. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **270**, 1345-1358.

-Cassel, J.C., Jeltsch, H., Neufang, B., *et al.* (1995). Downregulation of muscarinic and 5-HT_{1B}- mediated modulation of [³H] acetylcholine release in hippocampal slices of rats with fimbria-fornix lesions and intrahippocampal

grafts of septal origin. *Brain Res.* **704**, 153-166.

-Chaput Y, Blier P, y de Montigny C. (1986). *In vivo* electrophysiological evidence for the regulatory role of autorreceptors on serotonergic terminals. *The Journal of Neuroscience.* **6**, 2796-2801.

-Chazal, G, y Ralston, H.J. (1987). Serotonin-containing structures in the nucleus raphe dorsalis of the cat: An ultrastructural analysis of dendrites, presynaptic dendrites, and axon terminal. *J. Comp. Neuro.* **259**, 317-329.

-Chao, M. Y., Komatsu, H., Fukuto, H. S., *et al.* (2004). Feeding status and serotonin rapidly and reversibly modulate a *Caenorhabditis elegans* chemosensory circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 15512–15517.

-Clemett, DA., Punhani, T., Duxon MS., *et al.* (2000). Immunohistochemical localisation of the 5-HT_{2C} receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacology.* **39**, 123-132.

-Conner, D.A., y Mansour, T.E., (1990). Serotonin receptor-mediated activation of adenylate cyclase in the neuroblastoma NCB20: a novel 5-Hydroxytryptamine receptor. *Mol. Pharmacol.* **37**, 742-751.

-Craig, D.A., Clarke, D.E. (1990). Pharmacological characterization of a neuronal receptor for 5-hydroxytryptamine in guinea-pig ileum with properties similar to the 5-hydroxytryptamine₄ receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **252**, 1378-1386.

-Dahlstrom, A. y Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia.* **20**, 398-399.

-De Chaffoy, D.E., Courcelles, D., Leysen, JE., *et al.* (1985). Phospholipid turnover is the signal transducing system coupled to serotonin-S₂ receptor sites. *J. Biol. Chem.* **260**, 7603-7608.

-De Miguel, F.F., Vargas-Caballero, M., García-Pérez, E. (2001). Spread of synaptic potentials through electrical synapses in Retzius neurons of the leech. *J Exp Biol.* **204**, 3241-3250.

-De Montgny, C. y Aghajanian, G.K. (1977). Preferential action of 5-methoxytryptamine and 5-methoxydimethyltryptamine on presynaptic serotonin receptors: A comparative iontophoretic study with LSD and serotonin. *Neuropharmacology.* **16**, 811-818.

-Dietzel, I.D., Drapeau, P., Nicholls, J.G. (1986). Voltage dependence of 5-hydroxytryptamine release at a synapse between identified leech neurons in culture. *J. Physiol.* **372**, 191-205.

-Doyle, V.M., Creba, J.A., Ruegg, U.T., *et al.* (1986). Serotonin increases the production of inositol phosphates and mobilises calcium via de 5-HT₂ receptorin A7r5 smooth muscle cells. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* **333**, 98-103.

-Drapeau, P., Melinyshyn E., Sanchez-Armass S. (1989). Contact-mediated loss of the nonsynaptic response to transmitter during reinnervation of an identified leech neuron in culture. *J. Neurosci.* **9**, 2502-2508.

-Drapeau, P., Y Sanchez- Armass, S. (1988). Selection of postsynaptic serotonin receptors during reinnervation of an identified leech neuron in culture. *Journal of Neuroscience.* **8**, 4718-4727.

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

-Elswood, C.J., Bunce, K.T., Humphrey, P.P.A., (1991). Identification of putative 5-HT₄ receptors in guinea-pig ascending colon. *Eur. J. Pharmacol.* **196**, 149-155.

- Erickson, J.D., Eiden, L.E., Hoffman, B.J. (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 10993-10997.
- Erlander, M.G., Lovenberg, T.W., Baron, B. M., *et al.* (1993). Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 3452-3456.
- Falck, B., Hillarp, N.A., Thieme, G., *et al.* (1962). Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem Cytochem.* **10**, 348.
- Fayolle, C., Fillion, M.P., Barone, P., *et al.* (1988). 5-Hydroxytryptamine stimulates two distinct adenylate cyclase activities in rat brain: high-affinity activation is related to a 5-HT₁ subtype different from 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, AND 5-HT_{1C}. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2**, 195-214.
- Fernández de Miguel, F. y Drapeau, P. (1995). Synapse formation and function: insights from identified leech neurons in culture. *Journal of Neurobiology.* **27**, 367-379.
- Foguet, M., Nguyen, H., Le, H., *et al.* (1992). Structure of the mouse 5-HT_{1C}, 5-HT₂ and stomach fundus serotonin receptor genes. *Neuroreport.* **3**, 345-348.
- Fornal, C.A, y Jacos, B. L. (1988). Physiological and behavioral correlates of serotonergic single-unit activity. En: *Neuronal Serotonin*, ed. By N. N. Osborne and M. Hamon, Wiley. pp. 305-345.
- Fornal C. A., Marrosu, F., Metzler, C.W, *et al.* (1994). Effects of the putative 5-hydroxytryptamine_{1A} antagonists BMY 7378, NAN 190 and (-)-propranolol on serotonergic dorsal raphe unit activity in behaving cats. *J Pharmacol Exp Ther.* **270**, 1359-1366.

-Francis, P.T., Pangalos, M.N., Pearson, R.C., *et al.* (1992). 5-Hydroxytryptamine_{1A} but not 5-hydroxytryptamine₂ receptors are enriched on neocortical pyramidal neurones destroyed by intrastriatal volkensin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**, 1273-1281.

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

-Friesen, W.O., Poon, M. y 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., Nicholls, J.G., y Ready, D.F. (1981). Membrane properties and selective connections of identified leech neurones in culture. *Journal of Physiology (London)*. **316**, 203-223.

-Fuchs, P.A., Henderson, L. y Nicholls, J.G. (1982). Chemical transmission between individual Retzius and sensory neurones of the leech in culture. *Journal of Physiology (London)*. **323**, 195-210.

-Fuxe, K., Calza, L., Benfenati, F., *et al.* (1983). Quantitative autoradiographic localization of [3H]imipramine binding sites in the brain of the rat: relationship to ascending 5-hydroxytryptamine neuron systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 3836-3840.

-Fuxe, K., Li, X.M., Bjelke, B., *et al.* (1994). Possible mechanisms for the powerful actions of neuropeptides. *Annals of the New York Academy of Sciences* **739**, 42-59.

-Gale, J.D., Grossman, C.J., Whitehead, J.W.F., *et al.* (1994). GR113808-A novel, selective antagonist with high affinity at the 5-HT₄ receptor. *Br. J. Pharmacol.* **111**, 332-338.

-Gallager, D.W. y Aghajanian, G.K. (1976). Inhibition of firing of raphe neurones by tryptophan and 5-hydroxytryptophan: Blockade by inhibiting serotonin synthesis with Ro-4-4602. *Neuropharmacology*. **15**, 149-156.

-Gershon, M.D., Liu, K.P., Karpiak, S.E., *et al.* (1983) Storage of serotonin in vivo as a complex with serotonin-binding protein in serotonergic neurons. *J.Neurosci*. **3**, 1901-1911.

-Gobert, A., *et al.* (1995). Modulation of the activity of central serotonergic neurons by novel serotonin 1A receptor agonists and antagonists: a comparison to adrenergic and dopaminergic neurons in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. **273**, 1032-1046.

-Gocht, D. y Heinrich R. (2007). Postactivation inhibition of spontaneously active neurosecretory neurons in the medicinal leech. *J Comp Physiol A*. **193**, 347-361.

-Göthert, M. (1990). Presynaptic serotonin receptors in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*. **604**, 102-112.

-Graeff, F.G., Guimaraes, F.S., De Andrade, T.G., *et al.* (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacological and Biochemical Behavior*. **54**, 129-141.

-Groome, J.R., Clark, M. y 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., *et al.* (2000) Altered fear circuits in 5-HT(1A) receptor KO mice. *Biological Psychiatry*. **48**, 1157-1163.

-Gustafson, E. L., Durkin, M.M., Bard, J.A., *et al.* (1996). A receptor autoradiographic and in situ hybridisation analysis of the distribution of the 5HT7

receptor in rat brain. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 657-666.

-Hamblin, M.W., Metcalf, M.A. (1991). Primary structure and functional characterisation of a human 5-HT_{1D}-type serotonin receptor. *Mol. Pharmacol.* **40**, 143-148.

-Harel-Dupas, C., Cloez, I., Fillion, G. (1991). The inhibitory effect of trifluoromethylphenylpiperazine on [³H] acetylcholine release in guinea pig hippocampal synaptosomes is mediated by a 5-hydroxytryptamine₁ receptor distinct from 1A, 1B and 1C subtypes. *J. Neurochem.* **56**, 221-227.

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

-Heinrich R., Cromarty S. I., Hörner M., *et al.* (1999). Autoinhibition of serotonin cells: An intrinsic regulatory mechanism sensitive to the pattern of usage of the cells. *Neurobiology.* **96**, 2473-2478.

-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., *et al.* (1983) Structural and functional analysis of synaptic transmission between identified leech neurones in culture. *Journal of Physiology (London).* **340**, 347-358.

-Heym, J., Steinfels, G.F. y Jacobs, B. L. (1982). Medullary serotonergic neurons are insensitive to 5-MeODMT and LSD. *Eur. J. Pharmacol.* **81**, 677-680.

-Higley, J.D. y 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.

-Hjorth, D. y Magnusson, T. (1988). The 5-HT₁ receptor agonist, 8-OH-DPAT, preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo. *Neunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **338**, 463-471.

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

-Hull, E.M., Lorrain, D.S., Du, J., Matuszewich, L., *et al.* (1999) Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behavioral Brain Research*. **105**, 105-116.

-Hrdina, P.D., Foy, B., Hepner, A., *et al.* (1990) Antidepressant binding sites in brain: autoradiographic comparison of [3H]paroxetine and [3H]imipramine, localization and relationship to serotonin transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **252**, 410-418.

-Invernizzi, R., Carli, M., Di Clemente, A, *et al.* (1991). Administration of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in raphe nuclei dorsalis and medianus reduces serotonin synthesis in the rat brain: Differences in potency and regional sensitivity. *J. Neurochem.* **56**, 243-247.

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

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

-Jacobs, B.L., Heym, J, y Rasmussen, K. (1983). Raphe neurons: Firing rate correlates with size of drug response. *Eur. J. Pharmacol.* **90**, 275-278.

-Jahnsen, J.K.S. y 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., *et al.* (1996) Recent developments in neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Journal of Clinical Psychiatry.* **57**, 492-503.

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

-Julius, D., Huang, K.N., Livelli, T.J., *et al.* (1990). The 5-HT₂ receptor defines a family of structurally distinct but functionally conserved serotonin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 928-932.

-Katz, D.M. y Kimelberg, H.K. (1985). Kinetics and autoradiography of high affinity uptake of serotonin by primary astrocyte cultures. *J. Neurosci.* **5**, 1901-1908.

-Kalsner, S. (2000). The question of feedback at the somadendritic region and antidepressant drug action. *Brain Res Bull.* **52**, 467-473.

-Kia, H.K., Brisorgueil, M.J., Daval, G., *et al.* (1996). Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine 1A receptors in rat brain. *J. Neurosci. Res.* **46**, 697-708

-Kilbinger, H., Gebauer, A., Haas, J., *et al.* (1995). Benzimidazolones and renzapride facilitate acetylcholine release from guinea-pig myenteric plexus via 5-HT₄ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **351**, 229-236.

-Kimelberg, H.K. y Katz, D.M. (1985). High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. *Science.* **228**, 889-891.

-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.* **186**, 221-238.

- Kravitz, E.A., Glusman, S., Warrick-Harris R.M., *et al.* (1980). Amines and peptide as neurohormes in lobsters: actions on neuromuscular preparations and preliminary behavioural studies. *J. exp. Biol.* **89**, 159-175.
- Klein, M., Shapiro, E. y Kandel, E.R. (1980). Synaptic plasticity and the modulation of the Ca²⁺ current. *Journal of Experimental Biology.* **89**, 117-157.
- Kuffler, D.P., Nicholls, J.G. y 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.
- Kursar, J.D., Nelson, D.L., Wainscott, D.B., *et al.* (1992). Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of a novel serotonin receptor (5-hydroxytryptamine 2F) from rat stomach fundus. *Mol. Pharmacol.* **42**, 549-557.
- Leake, L.D., y Walker, R.J. (1980). *Invertebrate Neuropharmacology*, Halsted Press (John Wiley y Sons), New York. pp. 172-174.
- Lent, C.M. (1973) Retzius Cells: neuroeffectors controlling mucus release by the leech. *Science.* **179**, 693-696.
- Lent, C.M. y Frazer, B.M. (1977) Connectivity of the monoamine-containing neurones in central nervous system of leech. *Nature.* **266**, 844-847.
- Lent, C.M. (1985) Serotonergic modulation of the feeding behavior of the medicinal leech. *Brain Research Bulletin.* **14**, 643-655.
- Leonhardt, S., Herrick-Davis, K., Titeler, M. (1989). Detection of a novel serotonin receptor subtype (5-HT1E) in human brain: interaction with a GTP-binding protein. *J. Neurochem.* **53**, 465-471.

- Lessmann, V. y 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.
- Levy, F. O., Gudermann, T., Birnbaumer, M., *et al.* (1992). Molecular cloning of a human gene (S31) encoding a novel serotonin receptor mediating inhibition of adenylyl cyclase. *FEBS Lett.* **296**, 201-206.
- Liu, R.J., Lambe, E.K., y Aghajanian, G.K. (2005). Somatodendritic autoreceptor regulation of serotonergic neurons: dependence of L-tryptophan and tryptophan hydroxylase-activating kinases. *European Journal of Neuroscience*. **21**, 945-958.
- Liu, Y. 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., y Kravitz, E.A. (1980) Serotonin and octopamine produce opposite postures in lobsters. *Science*. **208**, 76-79.
- Lockery, S. R. y Kristan, W.B.Jr. (1991). Two forms of sensitization of the local bending reflex on the medicinal leech. *Journal of Comparative Physiology*. **168**, 165-177.
- López-Giménez, J.F., Mengod, G., Palacios, J.M., *et al.* (1997). Selective visualisation of rat brain 5-HT_{2A} receptors by autoradiography with [³H]MDL 100907. *Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol.* **356**, 446-454.
- Lovenberg, T.W., Baron, B.M., de Lecea, L., *et al.* (1993a). A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron*. **11**, 449-458.
- Lovenberg, T.W., Erlander, M.G., Baron, B.M., *et al.* (1993b). Molecular cloning and functional expression of 5-HT_{1E}-like rat and human 5-hydroxytryptamine

receptor genes. *Proc. Natl. Aca. Sci.* **90**, 2184-2188.

-Lovenberg, T.W., Erlander, M.G., Baron, B.M., *et al.* (1993). Molecular cloning and functional expression of 5-HT_{1E}-like rat and human 5-Hydroxytryptamine receptor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 2184-2188.

-Lum, J.T. y Piercey, M.F. (1988). Electrophysiological evidence that spiperone is an antagonist of 5-HT_{1A} receptors in the dorsal raphe nucleus. *Eur. J. Pharmacol.* **149**, 9-15.

-Markstein, R., Hoyer, D., Engel, G., (1986). 5-HT_{1A}- receptors mediate stimulation of adenylate cyclase in rat hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **333**, 335-341.

-Maura, G., Raiteri, M., (1986). Cholinergic terminals in rat hippocampus possess 5-HT_{1B} receptors mediating inhibition of acetylcholine release. *Eur. J. Pharmacol.* **129**, 333-337.

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

-Miller, K.J. y Teitler, M. (1992). Quantitative autoradiography of 5-HT-sensitive (5-HT_{1D}) and 5-HT-insensitive (5-HT_{1E}) serotonin receptors in human brain. *Neurosci. Lett.* **136**, 223-226.

-Miquel, M.C., Doucet, E., Boni, C., *et al.* (1991). Central serotonin_{1A} receptors: respective distributions of encoding mRNA, receptor radioimmunohistochemistry and autoradiographic mapping in the rat brain. *Neurochem. Int.* **19**, 453-465.

-Moukhles, H., Bosler, O., Bolam, J.P., *et al.* (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. (1981). Neurobiology of the leech. Cold Spring Harbor Publications, Cold Spring Harbor, New York.

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

-Nicholls, J. G. (1987). The search for connections: study of regeneration in the nervous system of the leech. En: Magnes Lecture Series, vol II. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

-Nicoll, R.A., Malenka, R.C., Kauer, J.A. (1990). Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* **70**, 513-565.

-Nusbaum, M.P. y 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.

-Nuttley, W. M., Atkinson-Leadbetter, K. P., Van der Kooy, D. (2002). Serotonin mediates food-odor associative learning in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**,12449–12454.

-Oleskevich, S. y Descarries, L. (1990). Quantified distribution of the serotonin innervation in adult rat hippocampus. *Neuroscience*. **34**, 19-33.

-Palacios, J.M., Markstein, R., Pazos, A. (1986). Serotonin-1C sites in the choroid plexus are not linked in a stimulatory or inhibitory way to adenylate cyclase. *Brain Res.* **380**, 151-154.

- Parker, R.M.C., Barnes, J.M., Ge, J., *et al.* (1996). Autoradiographic distribution of [³H] - (S)-zacopride-labelled 5-HT₃ receptors in human brain. *J. Neurolog. Sci.* **144**, 119-127.
- Payton, B. (1981). Structure of the leech nervous system. En: Muller, K.J., Nicholls, J.G. y Stent, G.S. (eds). *Neurobiology of the leech*. Cold Spring Harbor Publications. Cold Spring Harbor, New York. p. 35-50.
- Pazos, A., Cortes, R., Palacios, J.M. (1985a). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res.* **346**, 231-249.
- Pazos, A., Palacios, J.M. (1985b). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res.* **346**, 205-230.
- Pazos, A., Probst, A., Palacios, J.M. (1987). Serotonin receptors in the human brain-IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors. *Neuroscience.* **21**, 123-139.
- Plassat, J.-L., Amlaiky, N., Hen, R. (1993). Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol. Pharmacol.* **44**, 229-236.
- Pedigo, N.W., Yamamura, H. I., Nelson, D.L. (1981). Discrimination of multiple [³H] 5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in the rat brain. *J. Neurochem.* **36**, 205-230.
- Peroutka, S.J., Snyder, S. H. (1979). Multiple serotonin receptors: differential binding of [³H] spiroperidol. *Mol. Pharmacol.* **16**, 687-699.
- Peroutka. (1993). 5-Hydroxytryptamine receptors. *J Neurochem.* **60**, 408-416.

- Piñeyro, G., *et al.* (1996). Autoregulatory properties of dorsal raphe 5-HT neurons: possible role of electrotonic coupling and 5-HT_{1D} receptors in the rat brain. *Synapse*. **22**, 54-62.
- Pompeiano, M., Palacios, J. M., Mengod, G. (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in rat brain: correlation with receptor binding. *J. Neurosci.* **12**, 440-453.
- Pritchett, D.B., Bach, A.W.J., Wozny, M., *et al.* (1998a). Structure and functional expression of a cloned rat serotonin 5-HT-2 receptor. *EMBO J.* **7**, 4135-4140.
- Pritchett, D.B., Bach, A.W.J., Wozny, M., *et al.* (1988b). Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5-HT₂ receptor. *EMBO J.* **7**, 4135-4140.
- Prosser, R.A., Miller, J.D. y 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., *et al.* (2001) Extrasynaptic release of dopamine in a retinal neuron: activity dependence and transmitter modulation. *Neuron.* **30**, 211-225.
- Qian, Y., Melikian, H.E., Rye, B.R., *et al.* (1995). Identification and characterization of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. *J. Neurosci.* **15**, 1261-1274.
- Raleigh, M.J., McGuire, M.T., Brammer, G.L., *et al.* (1991). Serotonergic mechanisms promote dominance acquisition in adult male vervet monkeys. *Brain Research.* **559**, 181-190.
- Rogawski, M. A., Aghajanian G.K. (1991). Serotonin autoreceptors on dorsal raphe neurons: structure-activity relationships of tryptamine analogs. *J Neurosci.* **1**, 1148-1154.

- Rose, T., Gras, H., Hörner, M. (2006). Activity-dependent suppression of spontaneous spike generation in the Retzius neurons of the leech *Hirudo medicinalis*. *Invert Neurosci.* **4**, 169-176
- Rude, S., Coggeshall, E., Van Order, L. S., III. (1969). Chemical and ultrastructural identification of 5-hydroxytryptamine in an identified neuron. *J. Cell. Biol.* **41**, 832-854.
- 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. y 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. y 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.
- Sanders-Bush, E., Canton, H. (1995). Serotonin receptors: signal transduction pathways. En: Bloom, F.E., Kupfer, D.J. (Eds.), *Psychopharmacology, The Fourth Generation of Progress*. Raven, New York. p. 431-442.
- Sari, Y. (2004). Serotonin 1B receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* **28**, 565-582.
- Saudou, F., Hen, R., (1994). 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. *Neurochem. Int.* **25**, 503-532.
- Schoeffter, P. y Waeber, C (1994). 5-Hydroxytryptamine receptors with a 5-HT₆ receptor-like profile stimulating adenylyl cyclase activity in pig caudate

membranes. Naunyn-Schmied. *Arch .Pharmacol.* **350**, 356-360.

-Segal, M. (1980). The action of serotonin in the rat hippocampal slice preparation. *J. Physiol., Lond.* **303**, 423-439.

-Sharp, T., Bramwell, S.R, Clark, D, *et al.* (1989). *In vivo* measurement of extracellular 5- hydroxytryptamine in hippocampus of the anesthetized rat using microdialysis: Changes in relation to 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity. *J. Neurochem.* **53**, 234-240.

-Shenker, A., Maayani, S., Weinstein, J., *et al.* (1983). Enhanced serotonin-stimulated adenylate cyclase activity in membranes from adult guinea pig hippocampus. *Life Sci.* **32**, 2335-2342.

-Sinton, C. M. y Fallon, S. L. (1988). Electrophysiological evidence for a functional differentiation between subtypes of the 5-HT₁ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **157**, 173-181.

-Sprouse, J.S., y Aghajanian G.K. (1987). Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse.* **1**, 3-9.

-Sprouse, J.S., y Aghajanian, G.K. (1988). Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists: A comparative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology.* **27**, 707-715.

-Stam, N.J., Vanhuizen, F., Vanalebeek, C., *et al.* (1992). Genomic organization, coding sequence and functional expression of human 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptor genes. *Eur. J. Pharmacol.* **227**, 153-162.

-Stamford., *et al.* (2000). Control of dorsal raphe 5-HT function by multiple 5-HT(1) autoreceptors: parallel purposes or pointless plurality?. *Trends Neurosci.* **23**, 459-465.

- Steward, L.J., Ge, J., Stowe, R.L., *et al.* (1996). Ability of 5-HT₄ receptor ligands to modulate rat striatal dopamine release in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 55-62.
- Stewart, R.R., Adams, W.B., y Nicholls, J.G. (1989). Presynaptic calcium currents and facilitation of serotonin release at synapses between cultured leech neurons. *Journal of Experimental Biology.* **144**, 1-12.
- Stowe, R. L, Barnes, N.M. (1998). cellular distribution of 5HT₇ receptor mRNA in rat brain. *Br. J. Pharmacol*, **123**, 229p.
- Sze, J. Y., Victor, M., Loer, C., *et al.* (2000). Food and metabolic signaling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature.* **403**, 560-564.
- Taber, E., Brodal A., Walberg, F. (1960). The raphe nuclei of the brain stem in the cat. I. Normal topography and cytoarchitecture and general discussion. *J. Comp. Neurol.* **114**, 161-187.
- Tada, K., Fornal, C.A., Marrosu, F., *et al.* (1991). Single-unit responses of n. raphe dorsalis and centralis superior neurons to 5-HT_{1A} drugs in behaving cats. *Soc. Neurosci. Abstr.* **17**, 1437.
- To, Z.P., Bonhaus, D.W., Eglen, R. M., *et al.* (1995). Characterisation and distribution of putative 5HT₇ receptors in guinea pig brain. *Br. J. Pharmacol.* **115**, 107-116.
- Tobias, R., Gras Heribert, G. y Hörner M. (2006). Activity-dependent suppression of spontaneous spike generation in the Retzius neurons of the leech *Hirudo medicinalis L.* *Invert Neurosci.* **6**, 169-176.
- Tonini, M., Galligan, J.J., North, R.A. (1989). Effects of cisapride on cholinergic neurotransmission and propulsive motility in the guinea-pig ileum. *Gastroenterology.* **96**, 1257-1264.

- Tonini, M., Stefano, C.M., Onori, L., *et al.* (1992). 5-Hydroxytryptamine₄ receptor agonists facilitate cholinergic transmission in the circular muscle of guinea-pig ileum: antagonism by tropisetron and DAU6285. *Life Sci.* **50**, 173-178.
- Trueta, C., Mendez, B. y De-Miguel, F.F. (2003)a. Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurones. *Journal of Physiology (London)*. **547**, 405-416.
- Trueta. (2003)b. Secreción somática y sináptica de serotonina. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Fisiología Celular.
- Trulson, M.E., Crisp T. (1986). Do serotonin-containing dorsal raphe neurons possess autoreceptors?. *Exp Brain Res.* **62**, 579-586.
- Trulson, M. E., y Federickson, C.J. (1987). A comparison of the electrophysiological and pharmacological properties of serotonin-containing neurons in the nucleus raphe dorsalis, raphe medianus and raphe pallidus recorded from mouse brain slices *in vitro*: role of autoreceptors. *Brain Res Bull.* **18**, 179-190.
- Trulson, M.E., y Jacobs, B.L. (1976). Dose-response relationships between systemically administered L-tryptophan or L-5-hydroxytryptophan and raphe unit activity in the rat. *Neuropharmacology.* **15**, 339-344.
- Vandermaelen, C.P., Matheson, G.L., Wilderman, R.C, *et al.* (1986). Inhibition of serotonergic dorsal raphe neurons by systemic and iontophoretic administration of buspirone, a non-benzodiazepine anxiolytic drug. *Eur. J. Pharmacol.* **129**, 123-130.
- Velazquez-Ulloa, N., Blackshaw, S. E., Szczupak, L., *et al.* (2003). Convergence of mechanosensory inputs onto neuromodulatory serotonergic neurons in the leech. *Journal of Neurobiology.* **54**, 604-617.

- Verge, D., Daval, G., Marcinkiewicz, M., *et al.* (1986). Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J. Neurosci.* **6**, 3473-3482.
- Verge, D., Daval, G., Patey, A., *et al.* (1985). Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT_{1A} subtype. *Eur. J. Pharmacol.* **113**, 463-464.
- Wallis, D.I., Elliot, P. (1991). The electrophysiology of 5-HT Serotonin: Molecular biology, receptors and functional effects. Basel: Birkhauser Verlag 203–219 pp.
- Weiger, W.A. (1997) Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society.* **72**, 61-95.
- Weinshank, R.L., Zgombick, J.M., Macchi, M.J., *et al.* (1992). Human serotonin_{1D} receptor is encoded by a subfamily of two distinct genes: 5-HT_{1D α} and 5-HT_{1D β} . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 3630-3634.
- White, S.R., Fung, S.J., Jackson, D.A., *et al.* (1996) Serotonin, norepinephrine and associated neuropeptides: effects on somatic motoneuron excitability. *Progress in Brain Research.* **107**, 183-199.
- Wiersma, C.A.G. e Ikeda, K. (1964). Interneurons commanding swimmeret movements in the crayfish *Procambarus clarki*. *Comparative Biochemical Physiology.* **12**, 509-525.
- Willard, A.L. (1981). Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech. *J. Neurosci.* **1**, 936-944.
- Wilson, R.J., Kristan, W.B.Jr. y 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**, 1405-1414.

-Zaidi, Z.F. y 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.

-Zaidi, Z.F. y 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., *et al.* (2001) Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neuroscience Biobehaviour Reviews*. **25**, 637-645.