



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**El calcio y la actividad mitocondrial promueven la
exocitosis somática de serotonina**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

VANESSA DEL POZO SÁNCHEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. FRANCISCO RAFAEL FERNÁNDEZ
DE MIGUEL**

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Del Pozo

Sánchez

Vanessa

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

305604444

2. Datos del tutor

Dr.

Fernández

De-Miguel

Francisco Rafael

3. Datos del sinodal 1

Dra.

González

Gómez

Gertrudis Hortensia

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Fiordelisio

Coll

Tatiana

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Guerrero

Hernández

Agustín

6. Datos del sinodal 4

Dr.

García

Díaz

David Erasmo

7. Datos del trabajo escrito

El calcio y la actividad mitocondrial promueven la exocitosis somática de serotonina

68 pp

2015

Índice general

Abreviaturas.....	7
Resumen.....	9

1. Introducción

1.1 Liberación sináptica y extrasináptica.....	11
1.2 Serotonina: vías, efecto y función.....	13
1.3 Liberación extrasináptica de 5-HT.....	16
1.3.1 Liberación extrasináptica en neuronas de Retzius.....	17
1.4 Señalización de Ca^{2+} dentro de la mitocondria.....	20
1.5 Sistema nervioso de la sanguijuela y sus ventajas.....	23

Planteamiento del problema.....	27
--	-----------

Hipótesis.....	27
-----------------------	-----------

Objetivos.....	29
-----------------------	-----------

2 Métodos

2.1 Aislamiento y cultivo neuronal.....	31
2.2 Estimulación eléctrica y registro intracelular.....	32
2.3 Colocalización de mitocondrias y Ca^{2+} mitocondrial.....	33
2.4 Mediciones de Ca^{2+} citoplásmico intracelular y mitocondrial.....	34
2.5 Mediciones de exocitosis.....	34
2.6 Imágenes de fluorescencia.....	35
2.7 Análisis de imágenes.....	36
2.8 Farmacología.....	37

3 Resultados

3.1 Colocalización de Ca^{2+} mitocondrial y mitocondrias en neuronas de Retzius.....	39
3.2 Transitorios de Ca^{2+} mitocondrial y Ca^{2+} citoplásmico.....	40
3.3 Dependencia de la frecuencia de estimulación y los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$	43
3.3.1 Dependencia de la exocitosis somática respecto a la frecuencia.....	45
3.4 Efecto del Ru360 en la toma de Ca^{2+} mitocondrial y la exocitosis somática.....	46

4 Discusión

4.1 Importancia de la localización mitocondrial para la regulación de Ca^{2+}	49
4.2 Diferencias en los transitorios de las señales de Ca^{2+}	50
4.3 La regulación de Ca^{2+} y su relación con la exocitosis.....	51
4.4 Bloqueo del MCU y sus implicaciones.....	52

Conclusión.....	57
------------------------	-----------

Referencias.....	59
-------------------------	-----------

Abreviaturas

5-HT serotonina

ADP adenosin trifosfato

ATP adenosin trifostfato

CTE cadena transportadora de electrones

FADH₂ flavín adenín dinucleótido

GEP gradiente electroquímico de protones

MCU uniporter de calcio mitocondrial (*mitochondrial calcium uniporter*)

NADH nicotinamida adenina dinucleótido

SNC sistema nervioso central

VDAC canal aniónico dependiente de voltaje (*voltage dependent anion channel*)

VGCC canal de calcio dependiente de voltaje (*voltage gated calcium cannell*)

Resumen

La secreción somática de 5-HT ocurre como resultado de la estimulación eléctrica con trenes de diez impulsos a frecuencias mayores de 5 Hz. La despolarización de la neurona genera la entrada de calcio a través de canales sensibles al voltaje principalmente de tipo L. El calcio intracelular promueve la exocitosis de las vesículas adyacentes a la membrana y también la liberación de calcio inducida por calcio de los depósitos intracelulares. Esto es necesario para el transporte de cúmulos vesiculares hacia la membrana plasmática y su posterior fusión con ella. Sin embargo, falta aún explicar de qué manera el calcio induce el transporte activo de las vesículas a la membrana celular. Suponemos que el aumento de calcio libre promueve la toma de calcio por la mitocondria y la síntesis de ATP. Este ATP promoverá el transporte activo de las vesículas hacia los puntos de fusión. El objetivo de este trabajo fue estudiar si el incremento de Ca^{2+} libre citoplásmico induce la síntesis de ATP mitocondrial y así contribuye a la exocitosis somática de 5-HT. Encontramos que la localización mitocondrial en las neuronas de Retzius se caracteriza por dos esferas, una en el plasmalema celular fuera de la corteza de actina y en colocalización con las vesículas serotoninérgicas y otra rodeando el núcleo. Para conocer la dinámica de calcio citoplásmico y mitocondrial utilizamos los colorantes Fluo-4 y Rhod-2 respectivamente. Con ambos colorantes cuando las neuronas fueron estimuladas con un tren de 1 Hz se produjo un transitorio lento compuesto por la suma de los 10 transitorios continuos, sincrónicos al tren de estimulación. En contraste, los transitorios de calcio mitocondrial y citoplásmico producidos por la estimulación a 20 Hz consistieron en un transitorio rápido que alcanzó su punto máximo transcurridos 10.3 segundos después del tren y decae rápidamente. A su vez observamos que las cinéticas de Ca^{2+} citoplásmico y mitocondrial ocurren de manera simultánea, sugiriendo que la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria es muy rápida. Sugerimos que la mitocondria regula la exocitosis, en donde un tren a 10 Hz desencadena el 70% de la exocitosis somática, y debajo de esta amplitud del transitorio no existe correlación con la exocitosis. Al bloquear la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria con Ru360 hubo un decremento significativo de la exocitosis somática con respecto a las condiciones control de estimulación (tren de 20 Hz), sugiriendo que el Ca^{2+} dentro de la mitocondria activa la síntesis de ATP, que es utilizado para el transporte activo de los cúmulos vesiculares.

Introducción

1.1 Liberación sináptica y extrasináptica

La comunicación neuronal en el sistema nervioso es mediada por la transmisión sináptica. La sinapsis se refiere a la interacción entre las células nerviosas, en el que las señales van pasando de una célula a otra. Ésta puede ser química o eléctrica.

La sinapsis química es la conexión que ocurre en respuesta a un estímulo de la terminal nerviosa presináptica que dispara la liberación de moléculas de neurotransmisor hacia la hendidura sináptica, promoviendo la unión a receptores de canales iónicos de la membrana postsináptica (Nicholls et al., 2012). Las vesículas sinápticas se encuentran adosadas en una región específica, denominada “zona activa”, que contiene material electrodensito (Sudof, 2012). El neurotransmisor se libera cerca del receptor, permitiendo una transmisión rápida con un curso de milisegundos a segundos sobre la neurona blanco. Esto permite respuestas conductuales muy rápidas efectos muy localizados. A bajas frecuencias de disparo se liberan pequeñas cantidades cuánticas del neurotransmisor (Trueta et al., 2012).

La sinápsis eléctrica, ocurre en neuronas que se comunican a través de conexiones (en vertebrados) o panexones (en invertebrados). En ellas existe un flujo directo de la corriente, resultando ser mucho más rápida que la sinápsis química (Nicholls et al., 2012).

En cualquiera de los casos, la sinapsis se lleva a cabo en las terminales nerviosas de las neuronas (botones sinápticos).

Sin embargo, existe otra forma de comunicación que proviene de la liberación extrasináptica de moléculas. Esta parte de la liberación de transmisores por el cuerpo celular, los axones y las dendritas hacia el espacio extracelular. La glía juega un papel importante para ésta comunicación. Puede ocurrir a partir de la fusión de vesículas de núcleo claro (de ≈ 40 nm de diámetro) o de vesículas de núcleo denso (100 nm) (Coggeshall, 1972). Estas últimas pueden contener 15 veces más moléculas de neurotransmisor que las de núcleo claro. La fusión de estas vesículas necesita de transporte vesicular debido a la distancia a la que se encuentran de la membrana plasmática en reposo, que va de un rango nanométrico (en varcosidades) a micrométrico (en el soma) (Trueta et al., 2012). Por ello se requieren despolarizaciones más largas que las requeridas para la liberación sináptica de vesículas de núcleo claro (De-Miguel & Nicholls, 2015).

Casi todos los neurotransmisores se liberan de manera extrasináptica. Por ejemplo, la dopamina de las neuronas nigroestriatales (Patel et al., 2009), la oxitocina y vasopresina de las neuronas hipotalámicas (Ludwig et al., 2002), la serotonina de las neuronas de Retzius (Trueta et al., 2004), y el ácido γ -aminobutírico (GABA) de los neuronas dopaminérgicas de la retina (Hirawasa et al., 2015). A su vez, no sólo se movilizan neurotransmisores, sino moléculas de señalización como lípidos, proteínas y micro RNAs (De Miguel & Nicholls, 2015).

La transmisión extrasináptica no sólo regula respuestas eléctricas en neuronas, sino que regula la actividad de la glía, vasos sanguíneos y músculos (De Miguel & Nicholls, 2015), permite la comunicación de neuronas distantes entre sí, debido a su alta difusión (Bunin et al., 1998).

Este tipo de liberación es un mecanismo altamente regulado y distinto a la sinapsis, del que se desconocen muchos de los procesos involucrados y que suponen una importancia relevante en enfermedades neurodegenerativas (De-Miguel & Nicholls, 2015). Es por eso que estudiar este tipo de liberación se ha vuelto fundamental.

1.2 Serotonina: vías, efecto y función

La serotonina (5-HT), también conocida como 5-hydroxytryptamina o 3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-ol, es una monoamina perteneciente a la familia de las indolaminas. Está compuesta por un anillo indol hidroxilado en la posición 5, y una cadena lateral etilamínica. Se sintetiza a partir del triptófano de manera local en el sistema nervioso central (SNC) ya que no puede cruzar la barrera hematoencefálica, y funciona como sustrato para la síntesis de diversas moléculas (Arreola et al., 2015).

Dahlsrom y Fuxe en 1964 observaron que la mayoría de los cuerpos serotoninérgicos en vertebrados se encuentran en el núcleo de Raphé, y describieron nueve grupos de cuerpos celulares que contienen 5-HT, los cuales designaron desde B1 hasta B9. El número de neuronas serotoninérgicas de vertebrados es bajo en proporción al número total de neuronas del sistema nervioso, sin embargo, éstas se proyectan de manera ascendente hacia las regiones del mesencéfalo, rombencéfalo, límbica y cortical; formando uno de los sistemas eferentes más grande y complejo del cerebro e inervando de manera amplia el SNC (Figura 1) (Berger et al., 2009). Mengod et al., (2007) proponen que es así como la serotonina puede modular un amplia gama de procesos conductuales en humanos. En invertebrados, también se encuentra en pocas neuronas. Sin embargo, regula un gran número de funciones (Figura 2).

La serotonina funciona como transmisor al ser liberado de los botones sinápticos o como modulador con efectos parácrinos u hormonales, a partir de la liberación extrasináptica del soma, dendritas o axón (De-Miguel et al., 2012; De-Miguel y Trueta, 2005; Lesurtel et al., 2006).

En vertebrados e invertebrados la serotonina regula distintas funciones como el dolor (Jann y Slade, 2007), apetito (Berger et al., 2009), ciclo del sueño (Berger et al., 2009; Leiser et al., 2015; Monti, 2011), estados afectivos (Hariri et al., 2006 Lucki1998), conducta sexual (Berger et al., 2009; Deemyad et al., 2013; Uphouse

et al., 2014), cognición (McEntee et al., 1991; Berger et al., 2009; Leiser et al., 2015), lactancia, embarazo (Marshall et al., 2014; Matsuda et al., 2004; Ohara-Imaizumi et al., 2013), densidad ósea, regeneración del hígado (Lesurtel et al., 2006) y regeneración de tejido. La alteración del sistema serotoninérgico en humanos conduce a desórdenes psiquiátricos como esquizofrenia, ansiedad, depresión (Leiser et al., 2015; Bandelow et al., 2008), problemas alimenticios, violencia impulsiva y agresión (Brown et al., 1979; Brown et al., 1982; Linnoila et al., 1983; Frankle et al., 2005; Bubak et al., 2014).

Como molécula de señalización de manera endócrina, parácrina o yuxtacrina en vertebrados afecta al sistema inmune, gastrointestinal y nervioso e incluso juega un papel en la diferenciación celular y ontogenia (Arreola et al., 2015). Así como en el sistema vascular (Ni et al., 2006; Hamel, 2007), reproductivo (Oropeza et al., 2000; Bolte et al., 2001), respiratorio (Erickson et al., 2007; Marcos et al., 2003; Kereveur et al., 2000), metabólico (Hodges et al., 2008) y cardíaco (Langer et al., 2007). En invertebrados, regula funciones del sistema muscular, tal como la contracción y relajación de músculos (Twarog & Cole, 1972; Wabnitz & Von Wachtendonk, 1976), el aparato gastrointestinal (Ajmal & Ram, 1981; Phillis, 1966), cardíaco (Kravitz et al., 1980), movimiento de los cilios (Gosselin, 1961; Soliman, 1983), morfogénesis (Toneby, 1977), secreción de glándulas salivarias (Berridge & Heslop, 1982), control de fotorreceptores (Nassel et al., 1983), liberación de hormonas (Fingerman et al., 1981) y metabolismo (Rahman et al., 1983).

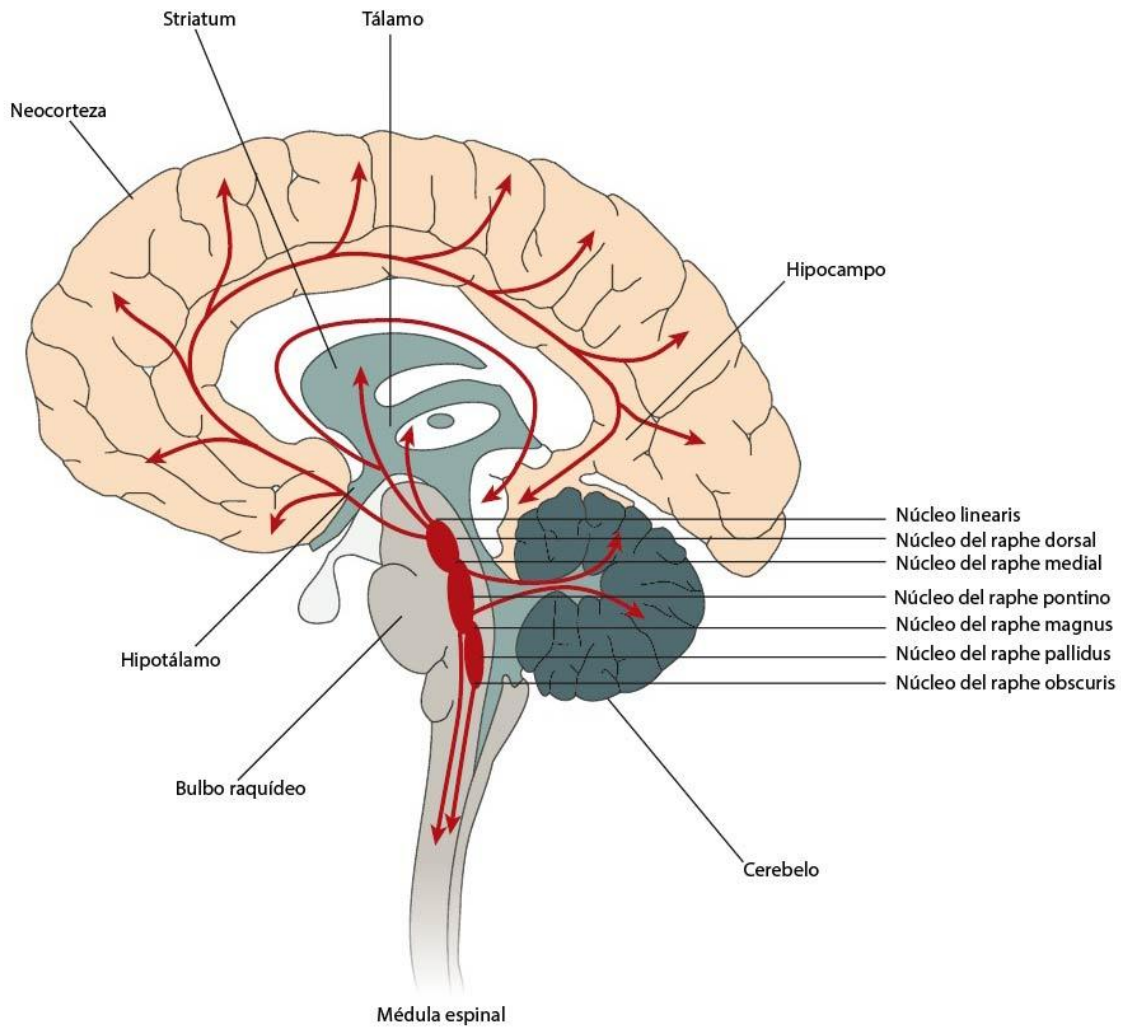


Figura 1. Vías centrales serotoninérgicas en vertebrados. En el sistema nervioso central (SNC), la serotonina se produce casi exclusivamente en las neuronas cuyos cuerpos están en los núcleos de Raphé situados en la línea media del tronco cerebral. Estas neuronas productoras de serotonina forman el sistema eferente más grande y complejo en el cerebro humano. El Raphé más caudal inerva la médula espinal, mientras que el Raphé más rostral, el núcleo de Raphé dorsal y el núcleo de Raphé medial, inervan la mayor parte del resto de la SNC mediante proyecciones difusas. (Modificado de Berger et al., 2009)

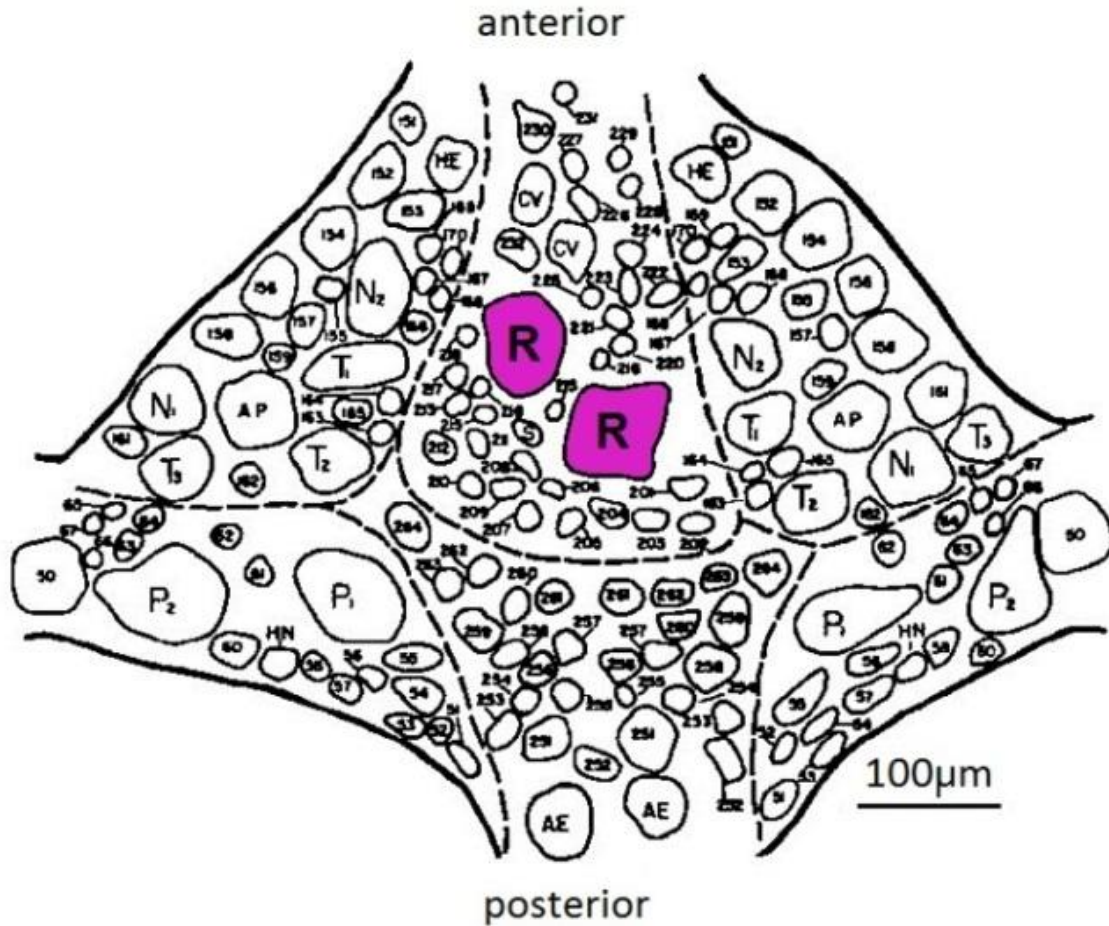


Figura 2. Mapa esquemático de las neuronas en un ganglio segmentario de sanguijuelas del género *Hirudo* (invertebrado). Dentro de cada segmento ganglionar se encuentran 7 neuronas que contienen 5-HT. Este número, es relativamente bajo en relación con las 400 presentes en todo el sistema. Sin embargo, modulan varias funciones como la actividad de muchos tejidos, el nado, la tensión, la liberación de mucosa y la conducta de alimentación. (Modificado de Muller et al. 1981)

1.3 Liberación extrasináptica de 5-HT.

Las neuronas serotoninérgicas de vertebrados e invertebrados liberan la 5-HT de manera extrasináptica, modulando sistemas de manera parácrina o volumétrica (De-Miguel et al., 2012; Fuxe et al., 2012). La liberación extrasináptica de este neurotransmisor sucede como resultado de la actividad eléctrica repetitiva a altas

frecuencias en las neuronas serotoninérgicas (Kravitz et al., 2000; Trueta et al., 2003). Esta liberación es dependiente de Ca^{2+} a través de la fusión de vesículas (Leon-Pinzon et al., 2014; DeKock et al., 2006) que se encuentran densamente empaquetadas en pequeños cúmulos (Bunin & Wightman, 1998; Iravani et al., 1997; Hery et al., 1981).

La estimulación eléctrica de las neuronas serotoninérgicas produce un aumento en de 5-HT en el medio extracelular y se ha supuesto que ésta puede difundir alrededor de 20 μm del sitio de liberación (Bunin & Wightman, 1998). Esta amplia difusión es mediada por la glía (Leon-Pinzon et al., 2014), permitiendo así la comunicación con neuronas aledañas y sinápsis.

1.3.1 Liberación extrasináptica en neuronas de Retzius.

El mecanismo de secreción somática de 5-HT en neuronas de Retzius se ha estudiado con microscopía electrónica de transmisión, en neuronas del ganglio fijadas antes y tras la estimulación. En el soma de las neuronas en reposo o estimuladas con un tren a 1 Hz, la mayoría de los cúmulos vesiculares se encuentran lejanos a la membrana plasmática y acoplados con mitocondrias (Figura 3B). En contraste, tras la estimulación con un tren de 10 impulsos a 20 Hz la mayoría de los cúmulos se encuentran adyacentes a la membrana plasmática (Figura 3C). La estimulación eléctrica a altas frecuencias moviliza a los cúmulos vesiculares para inducir la secreción somática.

Esta secreción es mediada por Ca^{2+} , que tras la estimulación de un tren a 20 Hz entra a la neurona a través de canales tipo-L (Trueta et al., 2003; Leon-Pinzon et al., 2014). La onda de Ca^{2+} se propaga hacia el centro celular y es amplificada debido a la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} por medio de los canales de rianodina presentes en los depósitos intracelulares, aumentando así la cantidad de Ca^{2+} libre en el citoplasma neuronal (Trueta et al., 2004).

Leon-Pinzon et al., (2014) estudiaron que el aumento de Ca^{2+} libre en el citoplasma de las neuronas de Retzius, aumenta la cantidad de cúmulos vesiculares que se exocitan. Esto sugiere la posibilidad de un transporte activo por motores de cinesina y miosina (De Miguel et al., 2012). Para que esto ocurra, es necesaria la asociación de mitocondrias y cúmulos vesiculares. La coexistencia de las mitocondrias, cúmulos vesiculares y retículo endoplásmico, permite la amplificación local de la onda de Ca^{2+} y propagación; seguida por la síntesis de ATP.

Si los cúmulos tienen que viajar más de 2 micrómetros el transporte es un sistema de tubulina-cinesina; sin embargo la última etapa de migración en la corteza tiene que ser complementado con el transporte de actina-miosina que los lleva a la membrana plasmática (De- Miguel et al., 2012). La evidencia directa de esto se ha visto al desacoplar los rieles de microtúbulos o bloqueando los motores de cinesinas, en el que en ninguno de los casos se ha observado exocitosis en respuesta a la estimulación eléctrica en neuronas de Retzius (Noguez et al., en preparación)

Los motores de cinesinas viajan a través de los rieles de microtúbulos gracias a la hidrólisis de ATP, llevando con ellos los cúmulos vesiculares (Bloom et al., 1995; Goldstein et al., 1993). Estos son motores protéicos conformados por dos cadenas pesadas idénticas y dos ligeras; en los que el dominio cabezal de la cadena pesada se encuentra ampliamente conservado y es el responsable de la hidrólisis de ATP y generación de la fuerza (Yang et al., 1990). La última etapa de migración de los cúmulos vesiculares a través de la corteza de actina tiene que ser complementado con el transporte de actina-miosina hacia la membrana plasmática y permite la fusión (Bi et al., 1997; De-Miguel et al., 2012) (Figura 3D).

La 5-HT liberada activa autoreceptores que inducen el incremento de calcio dentro del soma. Esto promueve más exocitosis. La 5-HT liberada actúa sobre las células gliales que rodean a las neuronas. Probablemente, es así como se transporta a otros sitios del sistema nervioso (Leon-Pinzon et al., 2014).

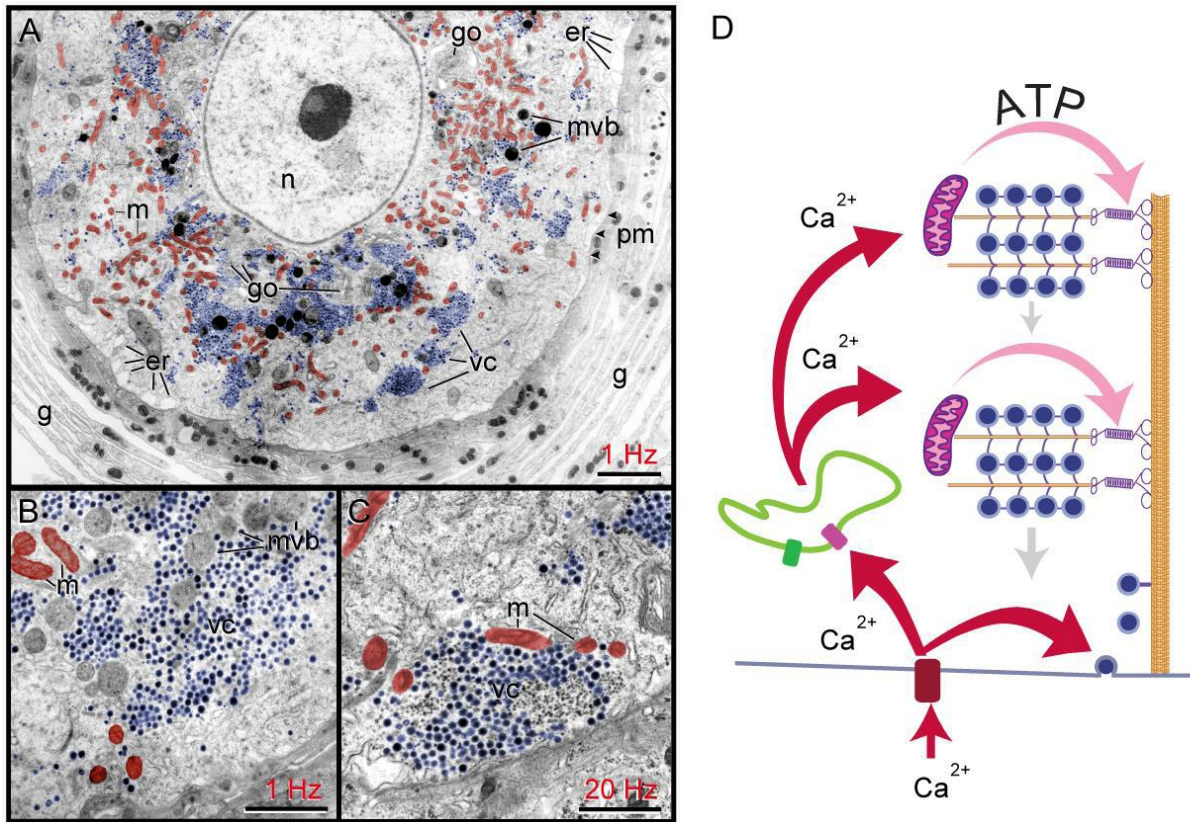


Figura 3. Estructura del soma de neuronas de Retzius en relación con el mecanismo de exocitosis (A) Micrografía electrónica del plano ecuatorial de una neurona de Retzius en ganglio, fijada tras la estimulación con trenes a 1 Hz, que no promueven la exocitosis. Se muestran los cúmulos vesiculares, pseudocoloreados en azul (vc), las mitocondrias, en tono rojo (m) y cuerpos multivesiculares (m vb), conforman poblaciones que rodean al núcleo celular (n) y distantes a la membrana plasmática (pm). En algunos casos se encuentran asociaciones con retículo endoplásmico (er) y aparato de golgi (go). También se observa una población de mitocondrias cercana a la membrana. La neurona está rodeada por capas de una célula glial (g). Barra escalar = 2 μ m. (B) Micrografía electrónica magnificada de una neurona estimulada a 1 Hz. Se muestran cuerpos multivesiculares resultantes de la endocitosis, mitocondrias y cúmulos vesiculares distantes a la membrana plasmática. Barra escalar = 1 μ m. (C) Micrografía electrónica magnificada tras la estimulación con trenes a 20 Hz. Los cúmulos vesiculares están adyacentes a la membrana plasmática. Barra escalar = 1 μ m. (D) Representación esquemática del mecanismo de secreción somática de serotonina. La estimulación mediante un tren de 10 impulsos a 20 Hz induce la entrada de Ca^{2+} a la neurona a través de canales tipo-L. Este calcio induce la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, presumiblemente activando a la mitocondria para la producción de ATP. El ATP activa a los motores moleculares que movilizan las vesículas hacia a membrana plasmática donde al fusionarse con ella liberan su contenido (Modificado de De- Miguel et al., 2012 y León-Pinzon 2014).

1.4 Señalización de Ca^{2+} dentro de la mitocondria.

La mitocondria regula un gran número de funciones, como la señalización de las especies reactivas de oxígeno (Kim et al., 2010; Li et al., 2013), el potencial de membrana (McBride et al., 2006), la apoptosis (Green et al., 1998; Hajnoczky et al., 2006), el metabolismo celular (McBride et al., 2006), la señalización hormonal (Pavon et al., 2012; Klinge et al., 2008) y la amortiguación de Ca^{2+} celular (Rossier et al., 2006; Brighton et al., 1974; Brighton et al., 1978). Sin embargo, el papel dominante de la mitocondria en células eucariontes es la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa, siendo este un mecanismo mediante el cual la célula asegura la producción de energía (Traaseth et al., 2004).

La toma de Ca^{2+} por la mitocondria puede influir en la supervivencia de la célula y varias funciones, como metabolismo, secreción, señalización y respiración celular. En este último caso, el Ca^{2+} activa un grupo de reacciones metabólicas mitocondriales que aumentan de manera significativa la tasa de producción de ATP.

La acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial requiere del paso Ca^{2+} a través de dos membranas mitocondriales: la externa y la interna. La membrana externa es permeable a solutos menores a 5 kDa, por lo que el Ca^{2+} entra con facilidad. La alta permeabilidad de esta membrana está relacionada con su proteína más abundante, el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), que permite la entrada y salida de metabolitos relacionados con la energía, como el succinato, piruvato, malato, NADH, ATP, ADP y el fosfato del citosol a la mitocondria (Patron et al., 2013).

Por el contrario, la membrana interna es impermeable a iones y necesita de vías electrogénicas para el traslocamiento del Ca^{2+} desde el espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial. Esta cuenta con dos canales selectivos de Ca^{2+} para lograrlo (Gunter et al., 1990): el uniporter de calcio mitocondrial (MCU) y el Ram (rapid mode). Ambos canales tienen el mismo complejo proteico pero una

conformación distinta, otorgando diferentes cinéticas al secuestro del Ca^{2+} (Gunter et al., 2004).

El Ram toma pequeñas cantidades de Ca^{2+} de manera rápida y momentánea, ya que este canal se bloquea instantáneamente después de la toma de Ca^{2+} y con concentraciones de Ca^{2+} intermembranales mayores a 110 nM. Por su parte, el MCU es un canal de multisubunidades con reguladores asociados que concuerda con la necesidad de un control estricto de las acciones pleiotrópicas de Ca^{2+} en la mitocondria y que cuenta con sitios de activación y de transporte separados. La toma de Ca^{2+} por este canal es atribuida al potencial de membrana altamente negativo de la mitocondria (Babcock et al., 1998). La fuerza que lo introduce es el gradiente electroquímico del Ca^{2+} , cuando su concentración intermembranal alcanza un rango entre 1-189 μM . El máximo flujo es de aproximadamente 5×10^6 iones de Ca^{2+} sin gasto energético (Gunter et al., 2004; Csordas et al., 2013; Baughman et al., 2011; Patron et al., 2013), siendo más rápido que cualquier bomba o intercambiador de iones.

Dentro de la mitocondria, el Ca^{2+} activa a tres deshidrogenasas acopladas al ciclo de Krebs: la piruvato deshidrogenasa, que es regulada por una fosfatasa dependiente de Ca^{2+} ; la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa, en las que el Ca^{2+} tiene un sitio de unión específico a la enzima (To et al., 2010; Balaban et al., 2009; Traaseth et al., 2004). Estas deshidrogenasas mitocondriales son sensibles a los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en un rango de 0.1 a 10 μM . Los niveles basales de $[\text{Ca}^{2+}]$ mitocondrial se encuentran entre 0.2 μM hasta 1 μM y niveles más bajos de Ca^{2+} activan a las deshidrogenasas (Traaseth et al., 2004). Lo anterior sugiere ser un control alternativo para la tasa metabólica celular, en donde la estimulación de estas deshidrogenasas aumenta la disponibilidad de NADH y FADH_2 .

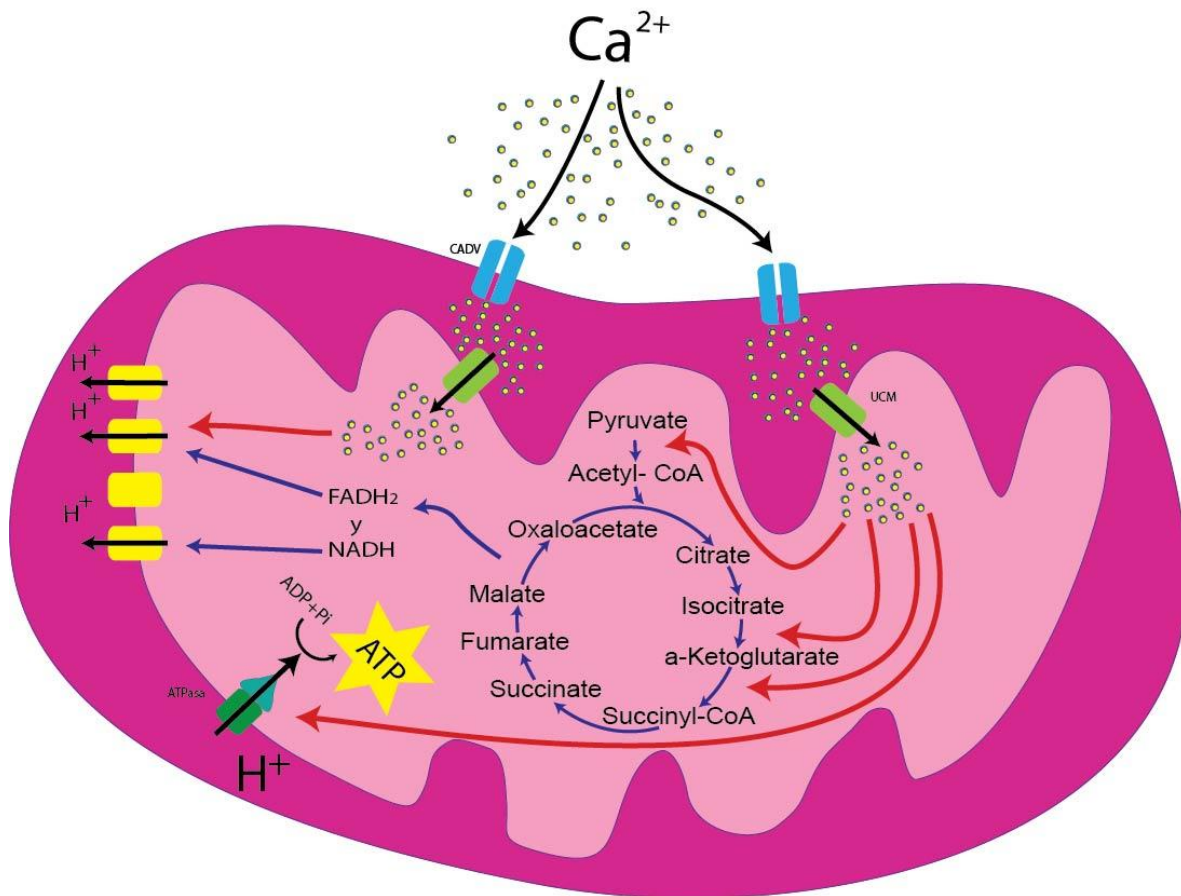


Figura 4. Representación esquemática de la influencia del Ca^{2+} mitocondrial en la síntesis de ATP. El flujo de los iones están indicados con flechas negras y el acoplamiento de Ca^{2+} en las síntesis de ATP está indicado con flechas rojas. El Ca^{2+} atraviesa la membrana externa por difusión y después entra al lumen mitocondrial por medio de el MCU y el MICU (canales verdes). Una vez dentro el Ca^{2+} se acopla a las deshidrogenasas del ciclo de Krebs y al complejo III y ATPasa de la fosforilación oxidativa. Promoviendo la respiración celular que como resultado produce ATP.

La producción de NADH y FADH_2 durante el ciclo de Krebs es fundamental para la fosforilación oxidativa, pues estas moléculas ceden su energía cuando se oxidan al sistema para activarlo (Mitchell et al., 1961). La fosforilación oxidativa se lleva a cabo gracias a cuatro complejos proteicos transmembranales (I, II, III y IV) y una proteína transmembranal con dos subunidades (F_0 y F_1) denominada ATPasa, conformando la cadena transportadora de electrones (CTE) (Slater et al., 1953; Kalckar et al., 1974). Como lo dice su nombre, este grupo de proteínas

transmembranales, con excepción de la ATPasa, transportan H^+ desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, generando dentro de este un gradiente electroquímico de protones (GEP), que promueve el flujo de H^+ a través de la ATPasa hacia la matriz en una reacción acoplada para la generación de ATP a partir de ADP y un fosfato inorgánico (Boyer et al., 1973; Chen et al., 2009). A su vez, dentro de la cadena transportadora de electrones, el Ca^{2+} activa puntos de control: translocasa adenín nucleótido, $F_0 F_1$ ATPasa , (Gunter et al., 2000) y complejo III (To et al., 2010, Balaban et al., 2009) .

Debido al potencial negativo de la membrana mitocondrial, el flujo de Ca^{2+} es energéticamente cuesta arriba, requiriendo una fuerza de aproximadamente 33kJ para extruir 1 mol de Ca^{2+} de la matriz hacia el espacio intermembranal. Esta demanda energética es demasiado alta, por lo que la mitocondria regula la termodinámica del sistema supliendo el Ca^{2+} por el Na^+ , permitiendo así la salida de Ca^{2+} de la mitocondria al citosol (Gunter et al., 2000) (Figura 4).

La evidencia anterior permite proponer que el incremento de Ca^{2+} libre en el citoplasma induce el secuestro por parte de la mitocondria ocasionando la síntesis de ATP. Esto ocurriría en el soma de las neuronas de Retzius. Presumiblemente este es el ATP libre hidrolizado por los motores vesiculares de cinesinas que movilizan las vesículas hacia la membrana plasmática donde al fusionarse liberan su contenido (De-Miguel et al., 2012a). Sin embargo, es necesario caracterizar las señales de Ca^{2+} citoplásmico y mitocondrial que promueven este incremento y evocan la exocitosis por medio de la regulación de la síntesis de ATP.

1.5 Sistema nervioso de la sanguijuela y sus ventajas.

Para este trabajo se utilizó una preparación clásica en neurobiología: las neuronas de Retzius del sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo verbana*. Por lo que en esta sección expongo las ventajas de esta preparación a este tipo de preguntas.

Las sanguijuelas son anélidos con cuerpos alargados y segmentados. Su cuerpo tiene 32 segmentos y una región no segmentada anterior llamada prostomio (Kristan et al., 2005). El sistema nervioso axial de este animal está compuesto por una cadena ganglionar, en la que cada ganglio controla un segmento corporal de manera relativamente independiente del resto. El sistema nervioso central está conformado por 21 ganglios segmentales, casi idénticos entre sí (en los que el 5to y 6to cuentan con un nervio extra conectado a los genitales), comunicados entre sí por conectivos. Además, los ganglios cefálico y caudal son más grandes que el resto. En ambos casos esto ocurre por la fusión temprana en el desarrollo de 4 ganglios y el prostomio, y 7 ganglios en la cola respectivamente (Figura 5).

La cadena ganglionar está encapsulada por una cubierta de tejido conectivo fibroso. Los ganglios están unidos entre sí por tres nervios conectivos, que son dos haces laterales grandes y uno medio más delgado denominado nervio de Faivre (Figura 5). La unión de la cadena ganglionar al cuerpo es a través de las raíces nerviosas que salen bilateralmente de cada ganglio y se ramifican en fascículos nerviosos pequeños que llevan fibras hacia y desde la periferia. Los cordones longitudinales y las raíces de los nervios bilaterales convergen en una masa central de neurópilo en el interior de cada ganglio. Estos ganglios cuentan con 400 neuronas unipolares que se comunican entre sí por miles de fibras en el neurópilo (Coggeshall et al., 1964; LeMarrec-Croq et al., 2013).

Las células nerviosas de este anélido han sido estudiadas ampliamente por sus propiedades morfológicas y electrofisiológicas. Las neuronas del SNC de la sanguijuela han sido identificadas por su forma, tamaño y localización, y nombradas por sus propiedades. Entre ellas se ubican las células P (que responden a presión aplicada a la piel), M (motoneuronas), T (sensibles al tacto), N (mecanosensoriales), y Retzius (serotonérgicas) (Figura 6).

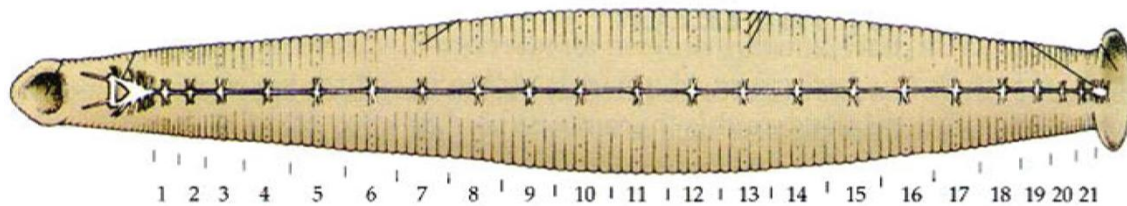


Figura 5. Esquema ventral del SNC de *Hirudo medicinalis*. Está conformado por 21 ganglios segmentales unidos entre si encontrados a lo largo de la sanguiuela. El ganglio cefálico y caudal tienen una fisonomía distinta debido a la fusión de varios ganglios (Tomado de Nicholls, 2001).

Las neuronas de la sanguiuela tienen la capacidad de regenerarse y mantener sus propiedades eléctricas tras haber sufrido una lesión (Baylor et al., 1971; Jahnsen et al., 1972), a diferencia del SNC de mamíferos. Lo anterior, aunado a la simplicidad estructural del SNC, ha permitido estudiar extensamente sus propiedades regenerativas, el desarrollo del mismo, las propiedades fisiológicas de las células neurogliales (Kuffler et al., 1966) y sus propiedades regenerativas (LeMarrec-Croq et al., 2013; Nicholls et al., 1968). Así como el estudio de las neuronas mecanosensoriales y sus receptores (Nicholls et al., 1968), el reciclaje vesicular en la sinápsis (Kuffler et al., 1987), la exocitosis somática (Trueta et al., 2003; Leon-Pinzon et al., 2014), los patrones de regeneración de células nerviosas (Baylor et al., 1971) y las conexiones sinápticas (Jahnsen et al., 1972).

El par de células gigantes localizadas en el centro ganglionar son las neuronas de Retzius (Figura 5), con diámetros que van de 60 a 80 μm y que contienen casi el 50% de la 5-HT del animal. Son las únicas neuronas del SNC de la sanguiuela que se proyectan a la periferia y modulan la actividad de muchas funciones, el nado, la tensión, la liberación de mucosa y la conducta de alimentación (Carretta et al., 1988; Lent et al., 1987; Lent et al., 1973; Leake et al., 1986).

Recientemente se ha mostrado que la liberación extrasináptica de 5-HT del sistema nervioso central de mamíferos es similar a la descrita en neuronas de Retzius (Kaushalya et al., 2008; Sarkar et al., 2012).

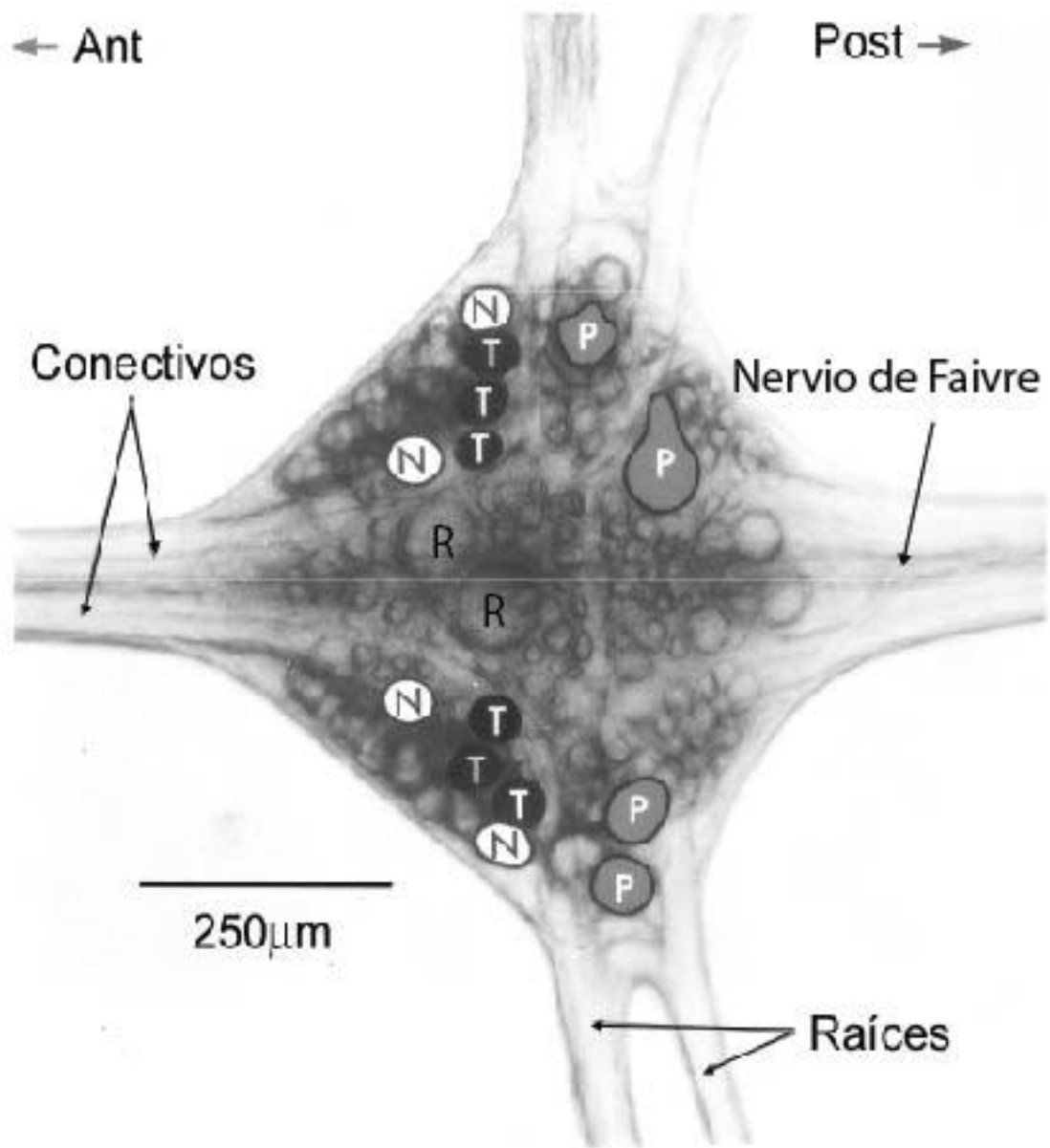


Figura 6. Fotomicrografía de un ganglio segmental observado con luz transmitida. Los ganglios se unen entre ellos por medio de los conectivos y las raíces nerviosas los conectan con la pared del cuerpo. Se pueden observar células individuales, identificando las células P, N, T y las gigantes centrales Retzius. Modificado de Baylor and Nicholls, 1968

Planteamiento del problema

La liberación extrasináptica de 5-HT requiere de una serie de procesos intermedios dependientes del ion calcio. La frecuencia de estimulación en neuronas determina la cantidad de Ca^{2+} presente en el citoplasma. Sin embargo, resulta intrigante conocer cómo estas señales se traducen para la movilización de las vesículas hacia la membrana y la exocitosis del cuerpo celular.

Hipótesis

Dado que es necesario el transporte activo de las vesículas a lo largo del citoesqueleto, suponemos que el Ca^{2+} intracelular entra a la mitocondria desencadenando la producción del ATP necesario para la activación de los motores de cinesina, encargados de la movilización de los cúmulos de vesículas hacia la membrana plasmática. Por ello si controlamos la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria podremos controlar la exocitosis.

Objetivos

General

- Estudiar cómo el incremento de Ca^{2+} libre citoplásmico y mitocondrial regula la exocitosis somática de los cúmulos vesiculares de 5-HT.

Particulares

- Conocer la localización de las mitocondrias y su relación con las vesículas y el Ca^{2+} mitocondrial dentro de las neuronas de Retzius.
- Estudiar las diferencias entre las señales de Ca^{2+} intracelular citoplásmico y mitocondrial producidas por trenes de estimulación eléctrica a 1, 2, 5, 10, 20 y 50 Hz.
- Estudiar la relación que existe entre la frecuencia de estimulación y la entrada de calcio a la célula y a la mitocondria.
- Bloquear la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria para analizar el efecto en la exocitosis.

Métodos

2.1 Aislamiento y cultivo neuronal

Los experimentos de este trabajo fueron realizados con neuronas de Retzius aisladas una a una de sanguijuelas *Hirudo verbana*. Las neuronas se aislaron siguiendo el procedimiento de Dietzel, *et al.* (1986) descrito a continuación. La cadena de ganglios se aisló bañada en una solución Ringer (NaCl 120 mM, KCl 4mM, CaCl 2mM, Tris-Maleato 10mM, pH de 7.4) bajo un microscopio estereoscópico, conservando las raíces de los ganglios segmentales unidas a un tejido conectivo para su sujeción posterior. Los ganglios se mantuvieron en medio de cultivo L-15 (Sigma-Aldrich) adicionado con 2% de suero bovino fetal (GIBCO) inactivado por calor, 6mg/ml de glucosa (Sigma-Aldrich) y 0.1mg/ml de gentamicina. Los ganglios se abrieron por la parte ventral con pinzas finas y se trataron con colagenasa-dispasa (Boehringer-Mannheim) durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo, se identificaron visualmente las neuronas de Retzius por su localización y tamaño característico, ya que son las más grandes en cada ganglio y se encuentran en la parte central.

Las neuronas se aislaron una a una mediante succión a través de una micropipeta de vidrio (Figura 7). Cada neurona se enjuagó varias veces con medio de cultivo L-15 adicionado con suero bovino fetal y glucosa, dentro de una campana de flujo laminar para limpiarlas, eliminar el debris y mantenerlas en condiciones de esterilidad. Entonces, se sembraron en platos de cultivo con fondo de vidrio (Falcon) tratados con concanavalina-A (2mg/ml) como sustrato (Sigma) y medio de cultivo L-15 adicionado. Se mantuvieron a 18-20°C y se registraron entre 1-5 días después de haberlas sembrado.

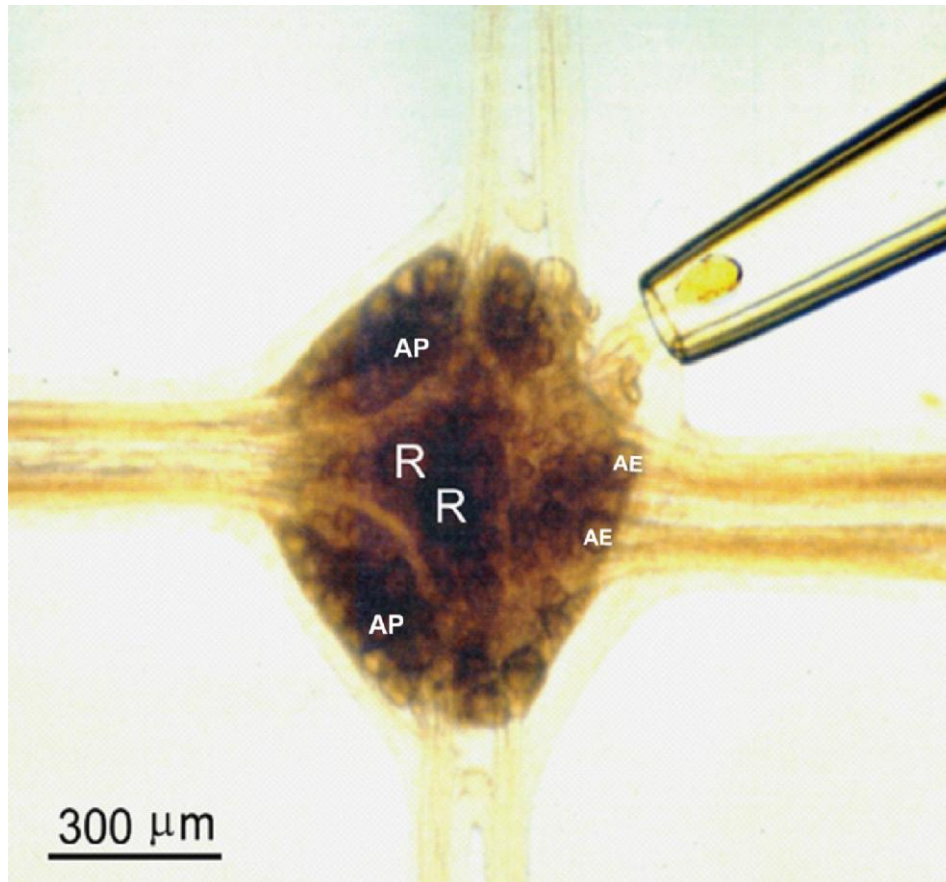


Figura 7. Aislamiento de neuronas de un ganglio de sanguijuela. La pipeta esta aislando una neurona por succión (R=neurona de Retzius). Tomado de Dietzel, *et al.*, 1986.

2.2 Estimulación eléctrica y registro intracelular

Para la estimulación y registro de 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 1.0 mm, un diámetro interno de 0.75mm y filamento interno (Federick Haer y Co), utilizando un estirador de pipetas Sutter P-97. Los microelectrodos tuvieron resistencias de 18-25 M Ω al ser llenados con cloruro de potasio (KCl) 3 M. La estimulación eléctrica se realizó

con un estimulador Grass S88 conectado a una unidad de aislamiento SIU5 (Grass Instruments), y consistió en un tren de 10 pulsos de corriente, que producen 10 potenciales de acción, a distintas frecuencias entre 1 y 50 Hz . Los registros eléctricos fueron adquiridos con un amplificador para el registro intracelular AxoClamp 2B (Axon Instruments) conectado a un osciloscopio digital Tektronics TDS2000 (Tektronics). Entre una estimulación y otra transcurrieron al menos 2 minutos para permitir la recuperación de la poza vesicular.

2.3 Colocalización de mitocondrias y Ca^{2+} mitocondrial

La localización de las mitocondrias dentro de las neuronas de Retzius en relación con el Ca^{2+} dentro de la mitocondria se realizó usando los colorantes fluorescentes MitoTracker Green FM (Molecular Probes), que tiñe las mitocondrias para su localización y Rhod-2 sal tripotásica (Molecular Probes), marcador fluorescente sensible a Ca^{2+} mitocondrial (Carrasco-Pozo et al., 2012; Babcock et al., 1997; Gunter et al., 2009; Csordas et al., 2013; Paredes et al., 2009). Ambos fueron disueltos en agua y llevados a una concentración 1mM. Las neuronas fueron incubadas con MitoTracker Green a una concentración final 5 nM durante 30 minutos. El colorante Rhod-2 se inyectó mediante iontoforesis (con microelectrodos de borosilicato) aplicando una corriente continua hiperpolarizante de -4 nA por 6 minutos dentro del soma de las neuronas Retzius. La punta de los microelectrodos se llenó de la solución del colorante por capilaridad y después el electrodo se rellenó con cloruro de potasio (KCl) 0.1 M. La toma de imágenes de fluorescencia fue realizada entre 10 a 15 minutos después de la inyección del colorante.

Utilizando el plugin de colocalización de ImageJ se calculó el coeficiente de solapamiento de las imágenes, usando el coeficiente de correlación de Pearson, que va de una escala de 0-1. Siendo 1 el mayor índice de correlación y 0 es su ausencia.

2.4 Mediciones de Ca^{2+} citoplásmico intracelular y mitocondrial

Los cambios relativos de concentración Ca^{2+} citoplásmico intracelular y mitocondrial se midieron simultáneamente usando los colorantes fluorescentes Fluo-4 sal pentapotásica (Molecular Probes), como marcador de Ca^{2+} intracelular y Rhod-2. Ambos colorantes en forma de sal fueron disueltos en agua y llevados a una concentración final de 5 mM para Fluo-4 y de 1 mM para Rhod-2. Los colorantes se inyectaron a las neuronas por iontoforesis.

2.5 Mediciones de exocitosis

Para estudiar la exocitosis se utilizaron los colorantes FM1-43 o FM4-64 (Molecular Probes). El colorante FM1-43 se utilizó en combinación con el Rhod-2, obteniendo un registro simultáneo de la exocitosis y la señal de Ca^{2+} mitocondrial. El colorante FM4-64 se utilizó en experimentos en los que solo se midió la exocitosis. El FM1-43 y FM4-64 son colorantes lipofílicos, que añadidos en el fluido extracelular, incrementan su fluorescencia cuando se unen a las membranas. Cuando ocurre la exocitosis, la membrana de las vesículas que se fusionan con la membrana plasmática queda también expuesta al colorante y al incrementarse la superficie de membrana unida al colorante hay un incremento en la intensidad de la fluorescencia. Los sitios en donde se incrementó la intensidad de la fluorescencia de FM1-43 corresponden entonces a sitios de secreción. Los colorantes FM4-64 y FM1-43 fueron añadidos al medio para llegar a una concentración final de 4 μM y 2 μM respectivamente. Transcurridos 10 minutos se introdujo al soma neuronal el microelectrodo intracelular hiperpolarizando a la

célula a -60 mV y estimulándola con un tren de 10 impulsos a dos frecuencias, 1 Hz y 20 Hz.

Tras la estimulación eléctrica, las células fueron lavadas durante dos minutos con solución Ringer (en el que el Ca^{2+} se reemplazó por Mg^{2+} para abolir la secreción, y enriquecido con glucosa [11mM]), seguido del lavado con solución Ringer durante 8 minutos. Es así como los valores de la exocitosis fueron medidos como el número de puntos/soma de FM1-43, producidos por la exo/endocitosis de los cúmulos vesiculares.

2.6 Imágenes de fluorescencia

La fluorescencia de los marcadores dentro de la célula se visualizó con un microscopio confocal Olympus FluoView FV1000, adquiriendo simultáneamente en dos canales y utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 60X (NA 1.10, Olympus). Para los registros simultáneos de la fluorescencia de MitoTracker Green y Rhod-2, las células se excitaron a 473nm y 559nm. Se adquirieron imágenes de 1024X1024 pixeles haciendo una reconstrucción en Z de la célula de 1 μm por paso.

Para registros simultáneos de las señales de Ca^{2+} mitocondrial y citoplásmico intracelular. Se tomaron imágenes confocales simultáneas de la fluorescencia de Fluo-4 y Rhod-2 en la zona ecuatorial de las neuronas. Usamos el láser de 488 nm para excitar el Fluo-4 y el 543nm para excitar el Rhod-2; los detectores de emisión espectral fueron de 500-530 nm para Fluo-4 y de 555-655 nm para el Rhod-2. Las imágenes se adquirieron cada 65 ms, con un zoom de 6 y una resolución de 256X256 pixeles durante 30 s. Durante la adquisición de imágenes se estimuló eléctricamente la célula con un tren de diez impulsos a distintas frecuencias de manera aleatoria (1, 2, 5, 10, 20 o 50Hz), inyectando corriente mediante un microelectrodo de borosilicato, con una resistencia entre 16-25M Ω .

En los registros simultáneos de la exocitosis y la señal de Ca^{2+} mitocondrial se tomaron imágenes utilizando una rutina del software Olympus FluoView FV1000, que alterna dos canales. El primer canal registrado era para conocer la señal rápida de Ca^{2+} mitocondrial con el colorante Rhod-2 ante el tren de estimulación. En este caso se excitó a 543 nm, y se adquirió con un espectro de emisión de 555-655 nm, cada 65 ms por 30 s con un zoom de 6. Después se alternó de canal, iluminando la célula a una longitud de onda de 488 nm y se adquirió la emisión en un rango entre 560-605 nm para detectar los cambios del colorante FM1-43. Las imágenes fueron tomadas cada 2.7 s por 15 minutos. El número de puntos/soma de FM1-43 fue cuantificado con la reconstrucción de un barrido en Z de 1 μm por paso después del lavado de las células con solución salina para eliminar el FM1-43 fuera de las neuronas.

2.7 Análisis de imágenes

Los análisis de datos se llevaron a cabo en una computadora personal. Las secuencias de imágenes obtenidas del software Olympus FluoView FV1000 (Scientific Solutions Business Group), se exportaron al software ImageJ (National Institutes of Health) para el análisis de la secuencia de imágenes. Estas se alinearon con el plugin de StackReg de ImageJ. El valor de colocalización de los colorantes fluorescentes MitoTracker Green y Rhod-2 se calculó con el plugin de Colocalization de Fiji (National Institutes of Health). Para calcular los cambios de fluorescencia relativa dependientes de Ca^{2+} , las señales fueron computadas como $(F-F_0/F_0)$ donde F es el total de la secuencia de imágenes y F_0 es el promedio de imágenes pixel por pixel antes de la estimulación. Valor al que nombramos dF/F . La variación en la intensidad de la fluorescencia se hizo mediante la selección de áreas de interés (ROI's, por sus siglas en ingles) de 1 μm de diámetro a lo largo del tiempo. Esta selección se utilizó para localizar los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada una de las áreas de interés en todas las secuencias de

imágenes (Se utilizaron frecuencias de estimulación de: 1, 2, 5, 10, 20 y 50 Hz; y tratamientos con Ru360).

Los parámetros de las cinéticas de los transitorios de Ca^{2+} citoplásmico, mitocondrial y exocitosis fueron determinados utilizando el software Igor Pro 6.2 (Wavemetrics). Los datos están presentados como la media \pm SEM.

2.8 Farmacología

Para explorar si la síntesis de ATP que depende de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria abole la exocitosis, se bloqueó el uniporter mitocondrial con Rutenio 360 (Millipore), añadiéndose en el medio a una concentración 10 μM durante 30 minutos a 18 °C (Garcia-Rivas et al., 2006; DeJesusGarcia-Rivas et al., 2005) y en otros casos por iontoforesis con pulsos de 1s durante 3 minutos.

Resultados

3.1 Colocalización de mitocondrias y Ca^{2+} mitocondrial en neuronas de Retzius

La distribución de las mitocondrias dentro de las neuronas de Retzius es consistente con la reportada por Trueta et al. (2012). Formando un par de “anillos”, en imágenes en 2D; uno en la periferia nuclear y otro en el plasmalema (Figura 1.1.1A). Este patrón es similar al de las vesículas setotoninérgicas reportado por De-Miguel 2012. A su vez, la mitocondria ocupa posiciones cerca de las fuentes o sumideros de Ca^{2+} , permitiendo el intercambio preferencial de Ca^{2+} entre organelos y la propagación de ondas de Ca^{2+} (Traaseth et al., 2004).

La colocalización de las mitocondrias y el Ca^{2+} mitocondrial se estudió a partir de dobles marcajes con Mitotracker-Green (Figura 7B) y Rhod-2 (Figura 7C) en el plano ecuatorial del soma neuronal. La microscopía confocal reveló un alto índice de colocalización entre las mitocondrias y el Ca^{2+} mitocondrial (Figura 7D). Calculado de 0.9 mediante el coeficiente de Pearson.

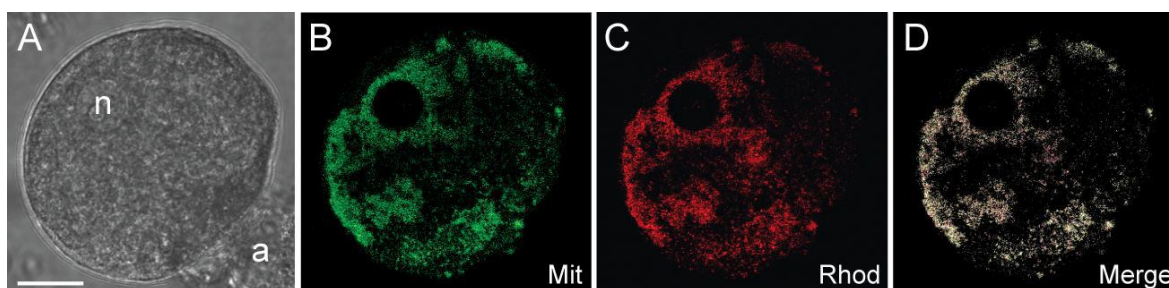


Figura 8. Distribución mitocondria s y Ca^{2+} mitocondrial en neuronas de Retzius. (A) Imagen de contraste de fase del soma de una célula de Retzius en cultivo. Se diferencia el núcleo (n) del axón (a). (B) Imagen de fluorescencia de MitotrackerGreen de la misma neurona. (C) Imagen de fluorescencia de Rhod-2 de la misma neurona. (D) Colocalización de ambas marcas, con un índice de correlación de 0.912. Escala de 20 μm .

3.2 Transitorios de Ca^{2+} mitocondrial y Ca^{2+} citoplásmico

Realizamos registros simultáneos de fluorescencia con microscopía confocal de los colorantes Fluo-4 y Rhod-2 para explorar la diferencia en el Ca^{2+} citoplásmico y mitocondrial.

La Figura 9 resume las cinéticas de los transitorios de Ca^{2+} citoplásmico y mitocondrial ante la estimulación con trenes de 1 ó 20 Hz. Cuando las neuronas fueron estimuladas con un tren de 1 Hz (Figura 9A, izquierda), se produjo un transitorio lento compuesto por la suma de 10 transitorios continuos cada uno en respuesta a un potencial de acción. Los transitorios con Fluo-4 y Rhod-2, fueron similares y sincrónicos al tren de estimulación. El valor máximo de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} citoplásmico y mitocondrial se observa transcurridos 10.33 segundos después del inicio del tren (Figura 9D). Al comparar la cinéticas de los transitorios de Ca^{2+} citoplásmico y mitocondrial, los datos de 8 células fueron normalizados y promediados. La amplitud del transitorio de Ca^{2+} mitocondrial fue 47.5 ± 8.4 % menor que la amplitud del Ca^{2+} citoplásmico, que se puede observar comparando los transitorios a 1 Hz de la figura 9B y 9C; sin embargo, los resultados al ser normalizados, no muestran diferencias respecto a la amplitud ni temporales (Figura 9D).

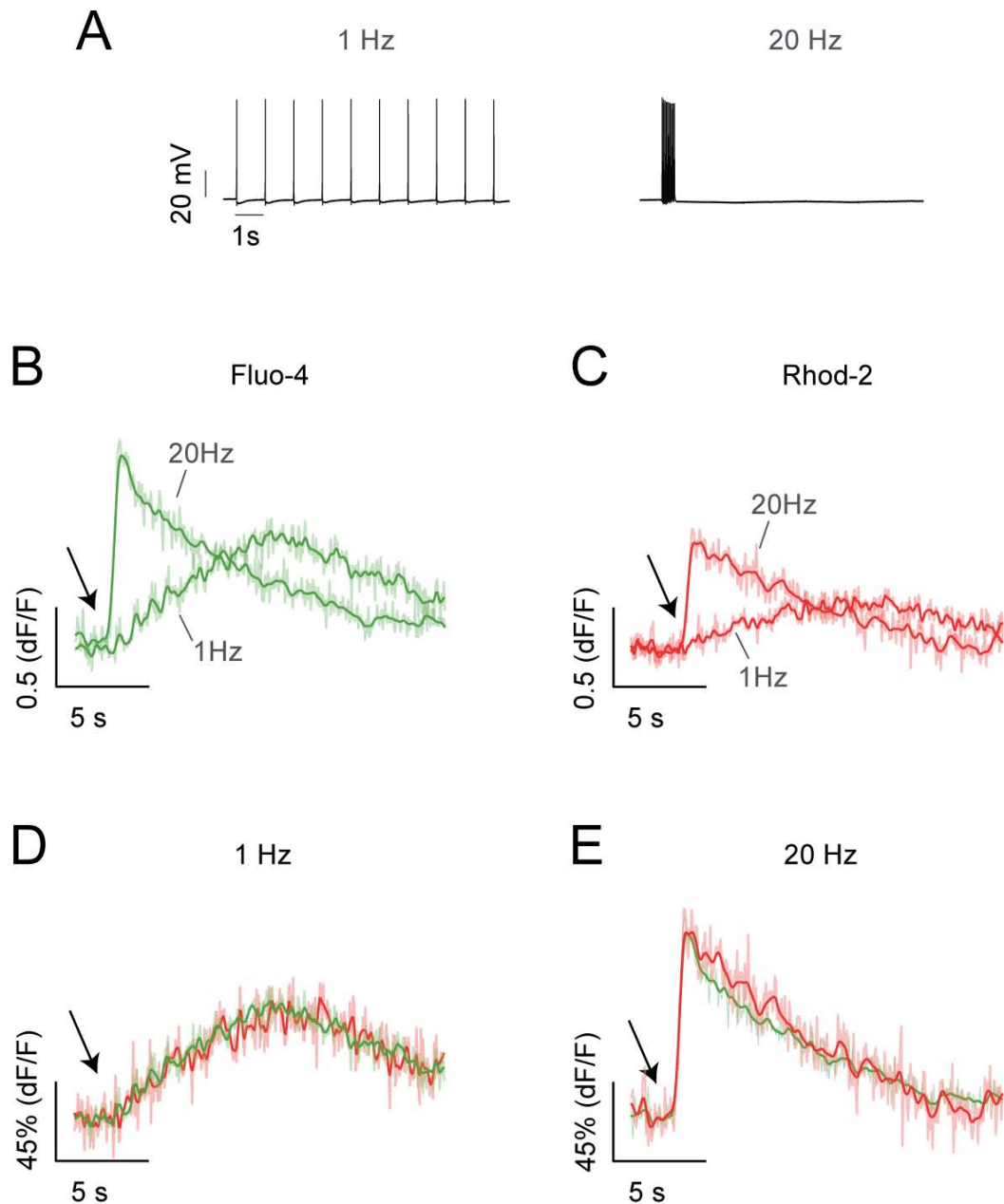


Figura 9. Transitorios de Ca^{2+} citoplásmico y mitocondrial. (A) Registros intracelulares de trenes de 10 potenciales de acción a 1 Hz (izquierda) y 20 Hz (derecha). (B) Sobreposición de la fluorescencia de Fluo-4 para medir el Ca^{2+} citoplásmico en respuesta a la estimulación con trenes de 10 impulsos a 1 Hz o 20 Hz. (C) Sobreposición de los transitorios de fluorescencia de Rhod-2, de 1 Hz o 20 Hz. En ambos casos la amplitud del transitorio en respuesta al tren de 20 Hz es mayor. (D) Sobreposición de los transitorios de Fluo-4 (verde) y Rhod-2 (rojo) en respuesta a un tren de 1 Hz. (E) Sobreposición de los transitorios de fluorescencia de Fluo-4 y Rhod-2 en respuesta a un tren de 20 Hz. Las flechas negras indican el comienzo de la estimulación.

El transitorio de Ca^{2+} producido por la estimulación a 20 Hz (Figura 9A, derecha) fue completamente distinto. Éste consistió en un transitorio rápido y robusto de la $[\text{Ca}^{2+}]$ que comenzó al inicio de la estimulación y alcanzó su amplitud máxima 580 ms después del inicio del tren en ambos casos. No se muestran diferencias entre los trazos respecto al tiempo pero si en la amplitud del transitorio, revelando un decremento del $19.2 \pm 12.9\%$ del transitorio de Ca^{2+} mitocondrial con respecto al citoplásmico (Figura 9B vs Figura 9C). Sin embargo, al ser normalizados no mostraron diferencias en la amplitud ni temporalidad (Figura 9E).

La amplitud de los transitorios rápidos de Fluo-4 fueron 45% veces mayores que la amplitud producida por el tren de 1 Hz (Figura 9B) y 65% mayor en el caso de Rhod-2 (Figura 9C). Se ha mostrado que las diferencias de amplitud entre los transitorios producidos por el tren 1 Hz y 20 Hz es la que dispara la exocitosis (Trueta et al., 2012). A su vez, el incremento ante el tren de 20 Hz es supralineal, debido a la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Leon-Pinzon et al., 2014).

Es importante remarcar que en ninguno de los casos hubo un solapamiento de las señales mayor al 10%, y que las propiedades de la matriz permiten una diferenciación clara de las señales de Ca^{2+} citoplásmico y mitocondrial. Esto se debe a que la matriz mitocondrial es altamente negativa, contribuyendo a la acumulación preferente de cationes permeables a la membrana. El colorante fluorescente Rhod-2 es un catión, acumulándose así preferentemente en las mitocondrias de células vivas. Por el contrario el colorante Fluo-4 es un anión, que sufre una repulsión por parte de la mitocondria.

3.3 Dependencia de la frecuencia de estimulación y los cambios en la $[Ca^{2+}]$.

La gran diferencia de los transitorios de Ca^{2+} a 1 y 20 Hz, nos hizo buscar cómo las variaciones en los transitorios de Ca^{2+} citoplásmico y mitocondrial dependen de la frecuencia de estimulación. Para estudiar este comportamiento, se estimularon eléctricamente las neuronas a 1, 2, 5, 10, 20 y 50 Hz con dobles marcajes de Rhod-2 y Fluo-4 (n=6). El intervalo entre pulsos fue de 2 minutos, lo que permitió la recuperación de los transitorios y de las pozas vesiculares.

La estimulación mediante trenes de impulsos, produjo un incremento sostenido en la $[Ca^{2+}]$ que aumentaba con una tendencia sigmoïdal dependiendo de la frecuencia de estimulación hasta los 20 Hz, para ambos marcajes. Sin embargo, a 50 Hz hay un decremento de del 26% de la amplitud del transitorio, con respecto a la observada ante el tren a 20 Hz en el Ca^{2+} citoplásmico y del 37 % el Ca^{2+} mitocondrial (Figura 10C).

Lo anterior nos hizo medir de manera indirecta la cantidad de Ca^{2+} libre durante los transitorios, independientemente del comportamiento de sus cinéticas. La diferencia de los valores de la integral del rango de frecuencias varía alrededor del del 25%, a diferencia del 70% observado en la amplitud del transitorio (Figura 10D). Esto sugiere que la $[Ca^{2+}]$ que dispara la excitosis es la acumulada de manera rápida, y no el total de la $[Ca^{2+}]$ que entra a la neurona a lo largo de la estimulación.

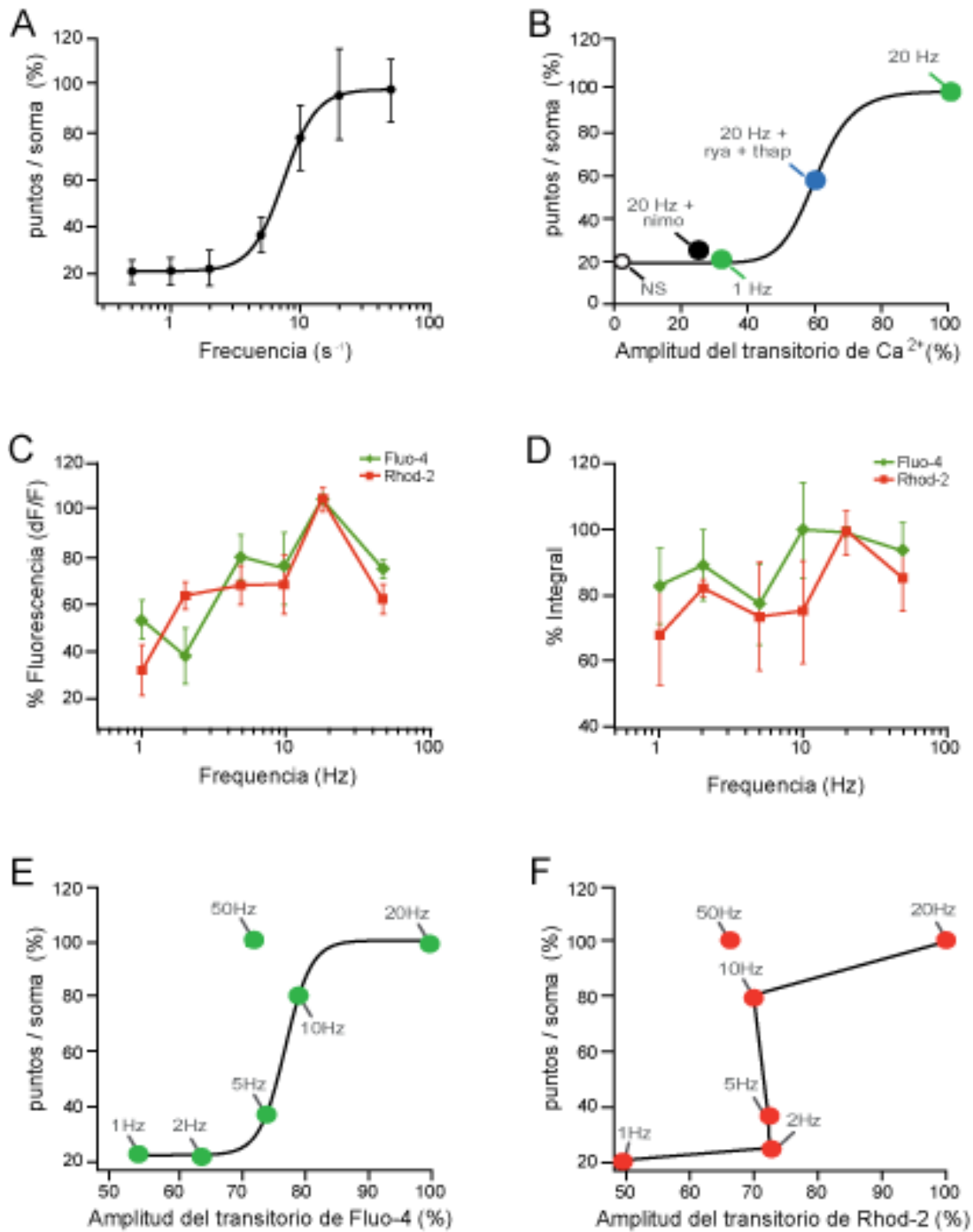


Figura 10. Dinámica del Ca²⁺ en función de la frecuencia y su dependencia para la exocitosis. (A) Dependencia de la frecuencia de exocitosis somática medida como el número puntos fluorescentes de FM1-43. (B) Diferentes fuentes de calcio participan en la exocitosis somática de serotonina. La curva negra es una función sigmoïdal que reproduce empíricamente la tendencia de los datos. Tomado de (Leon-Pinzon et al., 2014). (C) Amplitud porcentual de Fluo-4 (verde) y Rhod-2 (rojo) en función a la frecuencia de estimulación. (D) Integral de la fluorescencia

de Fluo-4 y Rhod 2 en función a la frecuencia de estimulación de Fluo-4 y Rhod-2. (E) Exocitosis porcentual en función de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} citoplásmico y (F) mitocondrial a diferentes frecuencias.

3.3.1 Dependencia de la exocitosis somática respecto a la frecuencia

Los trenes de potenciales de acción a frecuencias mayores de 5 Hz inducen la exocitosis con un retraso entre el comienzo del tren y la exocitosis que varía dependiendo de la distancia de las vesículas y el sitio de fusión y de la velocidad de transporte. El calcio en general está relacionado en los pasos tempranos o finales de la exocitosis, ya sea en el transporte vesicular, o en la fusión (Garcia et al., 2006)

Para conocer la relación entre la frecuencia de estimulación y la exocitosis somática usamos la fluorescencia del colorante FM1-43, que florece al unirse a las membranas lipídicas y tiñe las vesículas que se exo/endocitan tras la estimulación eléctrica a distintas frecuencias. La dependencia de la exocitosis somática con la frecuencia de estimulación es sigmoideal (Figura 10A). El mayor porcentaje de puntos/soma de FM1-43 se alcanza a frecuencias de 20 y 50 Hz. La propiedad sigmoideal puede depender de varias fuentes de Ca^{2+} involucradas en el proceso (Leon-Pinzon et al., 2014) (Figura 10B). En nuestros experimentos se ha reproducido esta tendencia a partir de la amplitud del Ca^{2+} citoplásmico y la exocitosis, con excepción de la amplitud en respuesta a la estimulación con el tren a 50 Hz (Figura 10E). Sin embargo, la dependencia de la frecuencia de estimulación para la exocitosis somática de las amplitudes del transitorio de Ca^{2+} mitocondrial se comporta como un escalón, con excepción ante 50 Hz. Esto podría sugerir que la toma de Ca^{2+} por parte de la mitocondria induce movilización de los cúmulos (Figura 10F).

3.4 Efecto del Ru360 en la toma de Ca²⁺ mitocondrial y la exocitosis somática.

El transitorio rápido de Ca²⁺ dentro de la mitocondria, acopla la estimulación eléctrica con la exocitosis. Implicando que el transporte vesicular y la exocitosis somática son dependientes del Ca²⁺ intracelular (Trueta et al., 2003, Huang et al., 2007, Leon-Pinzon et al., 2014). Nuestros datos apoyan la contribución del secuestro de Ca²⁺ por parte de la mitocondria ante la estimulación.

Para sustentar esto, medimos la exocitosis al bloquear la entrada de Ca²⁺ a la mitocondria. Para esto, utilizamos Ru360, un bloqueador específico del MCU, uniéndose a un sitio específico de la membrana mitocondrial (Matlib et al., 1998). El Ru360 se utilizó para inhibir la toma de Ca²⁺ mitocondrial tras la estimulación de las células a 20 Hz (n=3). La figura 11A muestra cinéticas representativas de los transitorios rápidos de Ca²⁺ mitocondrial bajo condiciones control y con tratamiento de Ru360. El incremento progresivo en el tiempo de incubación del Ru360 de las neuronas de Retzius, mostró un decremento de la señal de calcio mitocondrial en un $44.07 \pm 12\%$, mientras que en las neuronas control solo hubo un decremento de la señal de un $15 \pm 3.3\%$ (n=5), a un tiempo equivalente (Figura 11B). El tiempo de incubación fue de 30 minutos, y tiempos más largos se experimentaron. Sin embargo, no se observaron diferencias pasados los 30 minutos.

Experimentos realizados por Trueta et al., (2003) demostraron que cada soma produce entre 90 y 120 puntos fluorescentes en respuesta a un tren de impulsos a 20 Hz y entre 19 y 24 puntos en respuesta a la estimulación a 1 Hz (Figura 11E). Cada punto corresponde a la liberación de 100-1000 vesículas por cúmulo (De-Miguel et al., 2012), y cada una contiene alrededor de 90,000 moléculas de 5HT. En nuestro trabajo el número de puntos fue de 26 ± 3 en 8 neuronas (Figura 11C), similar al producido por un tren a 1 Hz (Figura 11E). Esto sugiere que el Ca²⁺ está actuando mediante inducción de la síntesis de ATP.

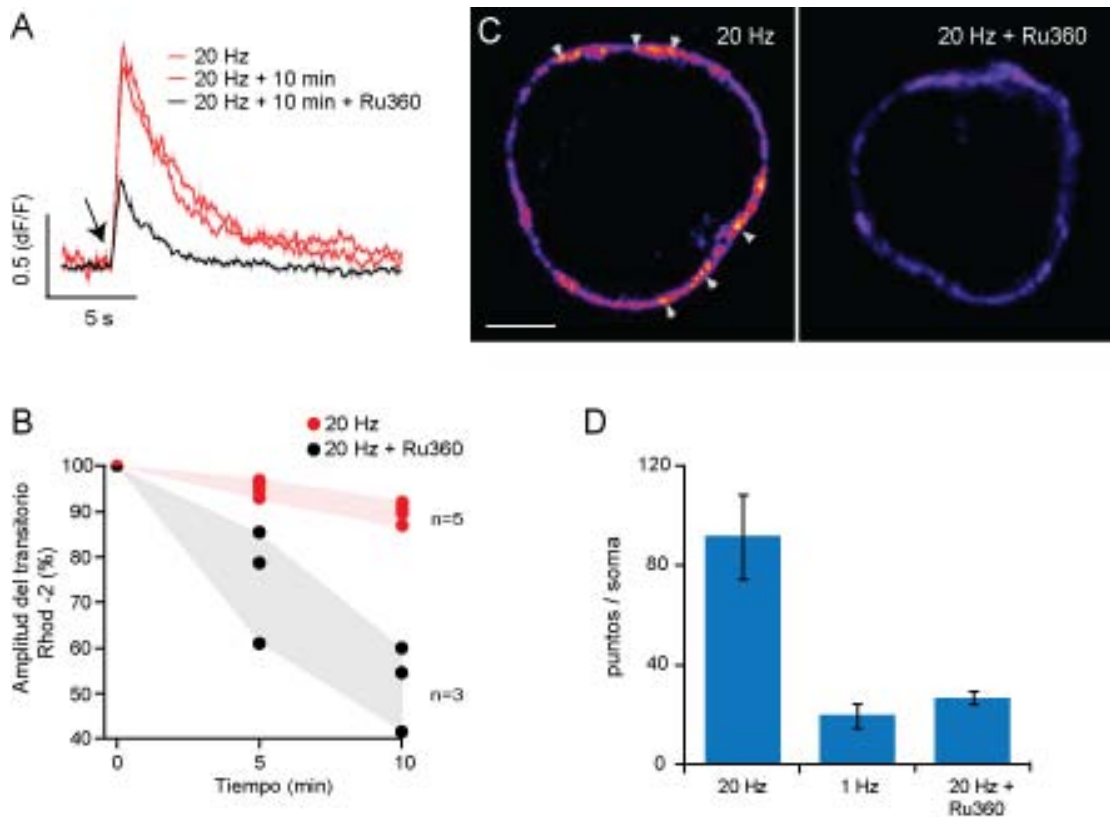


Figura 11. El complejo amina de Rutenio disminuye la toma de Ca^{2+} por parte de la mitocondria disminuyendo la exocitosis. (A) Sobreposición de las cinéticas de fluorescencia representativas de los transitorios de Ca^{2+} mitocondrial del soma neuronal bajo distintas condiciones experimentales descritas a continuación. El primer trazo rojo es en respuesta a la estimulación con un tren a 20 Hz y el segundo es la misma célula transcurridos 10 minutos en condiciones control. El trazo negro es de una neurona incubada durante 10 minutos con Ru360 10 μm en respuesta a un tren de 20 Hz. La flecha negra indica el comienzo de la estimulación (B) Porcentaje de la amplitud del transitorio de Rhod-2, que tiñe preferentemente Ca^{2+} mitocondrial en función al tiempo tras la estimulación de un tren a 20 Hz en condiciones control (puntos rojos) y con el bloqueo del UCM (uniporter de Ca^{2+} mitocondrial) con Ru360 (puntos negros). (C) Microscopía confocal del plano ecuatorial del soma de neuronas en cultivo estimuladas con un tren de 20 Hz en presencia de FM1-43 en el baño en condiciones control (izquierda) e incubada con Ru360 (derecha). Las flechas grises indican los puntos teñidos tras la estimulación. (D) Cuantificación del número total de puntos por soma bajo diferentes condiciones.

Discusión

En este trabajo estudiamos el papel del ciclo del Ca^{2+} en la actividad mitocondrial y en la exocitosis somática de 5-HT.

4.1 Importancia de la localización mitocondrial para la regulación de Ca^{2+}

Muchos marcadores fluorescentes de Ca^{2+} se han utilizado ampliamente para el estudio de su actividad en neuronas en cultivo y preparaciones *ex-vivo* (VandenBerghe et al., 2004).

La localización característica de las mitocondrias dentro de las neuronas de Retzius en reposo, no es al azar. En células cromafines, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC), mitocondrias, receptores de rianodina y cúmulos vesiculares se localizan estratégicamente juntos y cercanos a la membrana plasmática. Esto permite mayor control de la secreción (Montero et al., 2000). En neuronas, las mitocondrias aparecen en regiones sinápticas próximas a la membrana plasmática y asociadas con el retículo endoplásmico (Hayashi et al., 2009; Traaseth et al., 2004). Ahí acumulan grandes cantidades de Ca^{2+} ($>10\text{mmol/kg}$ en peso seco por mitocondria), y modulan los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la sinápsis, con lo que afectan la liberación de neurotransmisores (Patron et al., 2013). En neuronas de Retzius hay una configuración estructural similar entre mitocondrias, retículo endoplásmico y cúmulos vesiculares (De-Miguel et al., 2012d, Leon-Pinzon et al., 2014), que parece incrementar la eficiencia de la maquinaria de señalización de Ca^{2+} y secreción del cuerpo neuronal.A

La asociación estructural favorece la formación de microdominios de Ca^{2+} entre el retículo endoplásmico y las mitocondrias, permitiendo que la toma de Ca^{2+} por el MCU sea más rápida y como posible consecuencia se active la síntesis de ATP.

Esto sugiere que las mitocondrias en la zona periférica parecen estar altamente relacionadas con la secreción somática de 5-HT. Este anillo correspondería al depósito mitocondrial M1 caracterizado por Caricati-Neto et al., (2013), que censa microdominios altos de Ca^{2+} cerca de los VDCC, y que secuestra la mayoría del Ca^{2+} que entra por estos en células cromafines.

Por otra parte, Montero et al., (2000) reportaron que en células cromafines alrededor del 50% de las mitocondrias se localizan lejanas a la membrana plasmática y un 20% sin asociaciones con algún otro organelo celular, regulando otras funciones como es el metabolismo celular, la supervivencia celular y la interconversión de aminoácidos (Brookes2004). La posible función del anillo mitocondrial que rodea el núcleo celular y que entra en la clasificación del depósito M2 (Nunez et al., 2007; Garcia-Sancho et al., 2012, Caricati-Neto et al., 2013), parece censar concentraciones de Ca^{2+} muy pequeñas.

Sin embargo, esto no significa que no exista movilización de las mitocondrias dentro de las células. La redistribución de las mitocondrias ocurre para mantener la homeostasis del repertorio de Ca^{2+} intracelular (Chen et al., 2006) y podemos suponer que también la movilización con los cúmulos vesiculares (Trueta et al., 2012, Caricati-Neto et al., 2013).

4.2 Diferencias en los transitorios de las señales de Ca^{2+}

Las señales de Ca^{2+} dentro de las neuronas están involucradas en procesos como la neurodegeneración, crecimiento de neuritas, excitabilidad membranal y liberación de neurotransmisores (Nuñez et al., 2007). En estas, el organelo con mayor contribución al monitoreo, distribución y amortiguamiento de Ca^{2+} es la mitocondria. Las diferencias en las cinéticas en cuanto a la amplitud, no implican que el amortiguamiento por parte de la mitocondria del Ca^{2+} tenga poca eficacia a bajas y altas frecuencias (1 y 20 Hz). Esto se debe a que existe una gran dificultad

para la medición precisa de la cantidad de Ca^{2+} libre en pequeños organelos; en los que siendo las mitocondrias individuales muy pequeñas, las mediciones *in vivo* representan el promedio poblacional, e incluso distintos niveles de saturación del colorante.(Babcock et al., 1997). A su vez, dentro de la mitocondria los fosfolípidos de la membrana, las proteínas con sitios de unión a Ca^{2+} y los compuestos fosfatados amortiguan el Ca^{2+} (Babcock et al., 1997), por lo que hay una disminución de la amplitud, que no cuestiona la eficacia del amortiguamiento mitocondrial dentro del cuerpo celular.

Se estima que la velocidad proporcional de unión de Ca^{2+} en la mitocondria es 50 veces mayor que en el citosol, y que la entrada de Ca^{2+} a la célula durante la estimulación máxima, promueve el secuestro a una velocidad máxima de $4.6 \mu\text{M/s}$ (Gunter et al., 1990, Babcock et al., 1997), que es una tasa de entrada de Ca^{2+} comparable a la que permiten los VDCC en respuesta a la despolarización celular (Montero et al., 2000; Caricati-Neto et al., 2013; Thayer et al., 1990). Ligado a esto, la toma de Ca^{2+} mitocondrial se logra mientras la entrada de Ca^{2+} a la célula continua en progreso (Babcock et al., 1997, Babcock et al., 1998). Por tanto, es comprensible no encontrar un desplazamiento de las cinéticas, de la toma de Ca^{2+} a altas frecuencias (10, 20 y 50 Hz), respecto al tiempo.

El incremento paralelo y rápido de la cinéticas de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ocurre incluso tras incrementos pequeños de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ante la estimulación de las neuronas a frecuencias menores a 5 Hz, esto significa que este organelo cuenta con una autorregulan del metabolismo energético momento a momento (Babcock et al., 1997; Gunter et al., 1994; Hajnoczky et al., 2006).

4 .3 La regulación de Ca^{2+} y su relación con la exocitosis

Los incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en las neuronas se dan como resultado de la suma temporal de la entrada de Ca^{2+} en respuesta a la frecuencia de estimulación.

Mediante este proceso la entrada de Ca^{2+} transmembranal, por canales sensibles a voltaje tipo L a altas frecuencias de estimulación activa la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. Esta genera la mediación por varios puntos control. La exocitosis somática de 5-HT en las neuronas de Retzius aumenta al incrementar de la frecuencia de estimulación. Un tren de 10 impulsos a 1 Hz no evoca exocitosis, mientras que un tren a 20 Hz, promueve la exocitosis de un gran número de cúmulos vesiculares (Leon-Pinzon et al., 2014; Trueta et al., 2003; Trueta et al., 2004; Trueta et al., 2012). Un fenómeno distinto ocurre en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} mitocondrial. Es un fenómeno “todo o nada”, ya que en el tren de 10 Hz hay un umbral al 70 % de la máxima amplitud debajo del cual no se correlaciona con la exocitosis y por encima se produce el transitorio de manera todo o nada. Esto podría sugerir, que a esta frecuencia de estimulación, se han alcanzado los niveles necesarios de Ca^{2+} libre del citoplasma para la síntesis de ATP mediante la activación de las deshidrogenasas que incrementan la producción de NADH y FADH_2 , la actividad de la CTE. Entonces el manejo de Ca^{2+} por la mitocondria no amortigua las $[\text{Ca}^{2+}]_c$, sino que tiene consecuencias fisiológicas importantes en los transitorios excitotóxicos generados por la despolarización celular (Giovannucci et al., 1999; Caricati-Neto et al., 2013).

4. 4 Bloqueo del MCU y sus implicaciones

El manejo del Ca^{2+} por la mitocondria, tiene un papel importante para la exocitosis celular. En células cromafines de bovinos y ratas, al utilizar Carbonil Cianuro de 4- (trifluorometoxi) Fenilhidrazona (FCCP) o Carbonil Cianuro meta-Clorofenil Hidrazona (CCCP), compuestos que disipan el gradiente de protones y suprimen la capacidad de la mitocondria de amortiguar Ca^{2+} , se ha mostrado un incremento de la exocitosis (Montero et al., 2000; Caricati-Neto et al., 2013). Así mismo, en células cromafines tratadas con Ru360, hay un aumento de la secreción de acetilcolina (ACh) (Caricati-Neto et al., 2013), atribuible al

amortiguamiento de calcio en condiciones fisiológicas. Nuestros resultados en neuronas de Retzius incubadas con Ru360 y en células cromafines de ratones tratados con protonóforos FCCP y CCCP, hay una reducción de la exocitosis (Ales et al., 2005). Estas contradicciones se pueden deber a las características específicas de cada tipo celular (Garcia-Rivas et al., 2006), la dependencia de mayores cantidades de Ca^{2+} libre citoplásmico para la secreción y/o la movilización vesicular (Caricati-Neto et al., 2013).

La eficacia del bloqueo del MCU para la toma de Ca^{2+} mitocondrial con el Ru360 no es del 100% (Matlib et al., 1998). Sin embargo, en trabajos anteriores se ha logrado una eficacia del 50% en mitocondrias *in vitro* y una unión inespecífica del 30%. No obstante, esta unión inespecífica no afecta los canales sensibles a rianodina, la actividad de la actina-miosina ATPasa, los VDCC, ni la bomba intercambiadora de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Matlib et al., 1998). Esto sustenta que el Ru360 es el mejor bloqueador para nuestros fines, ya que el bloqueo inespecífico de estos podría haber resultado en falsos negativos respecto a la síntesis de ATP.

Podría suponerse que una manera de aumentar la eficacia en el bloqueo del MCU sería incrementando el tiempo de incubación del Ru360. Sin embargo, este tiene una fase rápida ($\tau_f = 3.6$ s), que corresponde a la unión a la superficie externa celular y otra lenta ($\tau_f = 28$ min) que refleja una entrada gradual de Ru360 a la célula. Transcurridos 30 minutos, el bloqueo es de $\sim 3\text{pmol}/10^6$ células (Matlib et al., 1998). Esto explica el porque no tuvimos mejores resultados al incrementar el tiempo de incubación (datos no mostrados).

La exocitosis somática en neuronas de Retzius depende de un transporte activo acoplado a microtúbulos, que se inhibe al desacoplar los microtúbulos con colchicina (De-Miguel et al., 2012). Cada cúmulo contiene alrededor de 100 a 100 vesículas. Se han caracterizado dos poblaciones de cúmulos vesiculares. La primera población se encuentra cercana a la corteza celular a una distancia de ~ 1.5 μm . La segunda población está a ~ 3.7 μm . Se ha calculado que cada vesícula consume alrededor de 10-100 moléculas de ATP, esto depende de la distancia a la que se encuentran del la membrana plasmática (De-Miguel et al., 2012). La

[ATP] en neuronas de Retzius en reposo es de 4.6 a 5.1 mM (Gunzel et al., 2001), concentración insuficiente para el transporte activo de los cúmulos vesiculares de 5-HT.

En este estudio, el aumento de la $[Ca^{2+}]_m$ a altas frecuencias de estimulación, promueve la exocitosis del cuerpo celular en cantidades semejantes a las reportadas por De-Miguel et al., (2012) y Leon-Pinzon et al., (2014). La dependencia de altas frecuencias es similar a la observada en la secreción somática de dopamina (Patel et al., 2009), así como la secreción de catecolaminas de células cromafines (Chow et al., 1996). El bloqueo de la toma de Ca^{2+} por el MCU, promueve un decremento significativo de la exo/endocitosis. Esto corrobora el disparo de la síntesis de ATP, para el transporte activo de los cúmulos vesiculares.

La co-localización de la población externa de cúmulos vesiculares y el depósito M1 de las mitocondrias en las neuronas de Retzius favorece la toma rápida de Ca^{2+} por la mitocondria y la subsecuente activación de los motores de cinesinas en respuesta a la estimulación eléctrica. Cuando se bloquea la entrada de calcio a la mitocondria, la exocitosis se redujo a la constitutiva que depende del transporte activo vesicular (De-Miguel et al., 2012). Algo similar ocurre en células cromafines (Caricati-Neto et al., 2013).

La mitocondria regula los últimos pasos de la exocitosis y el transporte vesicular mediante la toma de Ca^{2+} de los depósitos mitocondriales M1 y M2. El depósito M1 de células cromafines toma alrededor de 50 $\mu\text{mol/L/s}$ (Caricati-Neto et al., 2013), que corresponde al 30% de la velocidad máxima del MCU; mientras que la toma del depósito M2 es 150 veces más lenta. Por otra parte, la tasa de saturación de las cinéticas de Ca^{2+} entre M1 y M2 es muy distinta, siendo de 20 y 3 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente (Nunez et al., 2007; Garcia-Sancho et al., 2012; Caricati-Neto et al., 2013).

La región perinuclear contiene otra poza de cúmulos vesiculares en proceso de formación. Sin embargo, debido a su falta de maduración, la contribución de estas

vesículas a la exocitosis no se espera que ocurra en estas condiciones experimentales (Garcia et al., 2006).

Conclusiones

En este trabajo mostramos como la mitocondria es uno de los elementos que juega un papel fundamental en el complejo proceso de la exocitosis somática. En el que el Ca^{2+} que se propaga como onda dentro de la neurona tras la estimulación eléctrica promueve su captura por parte de la mitocondria a través del MCU. El incremento de Ca^{2+} libre mitocondrial es necesario para evocar la exocitosis, lo cual parece deberse a la síntesis de ATP. La la movilización de los cúmulos vesiculares puede entonces deberse a la activación de motores moleculares con ATP recién sintetizado como fuente energética.

Esta liberación, altamente regulada, permite explicar cómo es que las neuronas cuentan con unidades multifuncionales de liberación, que se suman a la complejidad del sistema nervioso.

En otros tipos neuronales como las nigroestriatales (Patel et al., 2009), y las hipotalámicas (Ludwing et al., 2002; Bergquist & Ludwing, 2008) la exocitosis se lleva a cabo debido al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre, en donde distintas fuentes de Ca^{2+} intervienen en la secreción. Podríamos suponer que una mecanismo similar de la dependencia de síntesis de ATP, regulada por Ca^{2+} mitocondrial, ocurre en distintos tipos de células nerviosas y otros tejidos, tanto de vertebrados como de invertebrados.

Referencias

- Ajimal G. S. and Ram J. L. (1981) Aplysia gastrointestinal tract motility: spontaneous activity and pharmacological sensitivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 68, 133-144.
- Arreola, R., Becerril-villanueva, E., Cruz-fuentes, C., Velasco-velázquez, M. A., Garcés-alvarez, M. E., Hurtado-alvarado, G., ... Pavón, L. (2015). Immunomodulatory Effects Mediated by Serotonin. *Journal of Immunology Research*, 2015, 21.
- Babcock, D. F., Herrington, J., Goodwin, P. C., Park, Y. B., & Hille, B. (1997). Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *The Journal of Cell Biology*, 136(4), 833–44. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2132502&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Babcock, D., & Hille, B. (1998). Mitochondrial oversight of cellular Ca²⁺ signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, 398–404. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959438898800676>
- Balaban, R. S. (2009). The role of Ca²⁺ signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(11), 1334–1341. doi:10.1016/j.bbabi.2009.05.011
- Bandelow, B., Zohar, J., Hollander, E., Kasper, S., Möller, H.-J., Zohar, J., ... Vega, J. (2008). World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for the pharmacological treatment of anxiety, obsessive-compulsive and post-traumatic stress disorders - first revision. *The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, 9(4), 248–312. doi:10.1080/15622970802465807
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. a, Sancak, Y., ... Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 341–5. doi:10.1038/nature10234
- Baylor, D. A., & Nicholls, J. G. (1971). Patterns of regeneration between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Nature*, 232(5308), 268–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4328425>
- Berger, M., Gray, J. a, & Roth, B. L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60, 355–366. doi:10.1146/annurev.med.60.042307.110802
- Bergquist F. & Ludwig M. (2008) Dendritic transmitter release: a comparison of two model systems. *J Neuroendocrinol* 20:677–686.
- Berridge M. J. and Heslop J. P. (1982) Receptor mechanisms mediating the action of 5-hydroxytryptamine. In *Neuropharmacology of Insects* (Edited by Evered D., O'Connor M. and Whelan J.), pp. 260-274. Pitman, London.

- Bi, G. Q., Morris, R. L., Liao, G., Alderton, J. M., Scholey, J. M., & Steinhardt, R. a. (1997). Kinesin- and myosin-driven steps of vesicle recruitment for Ca²⁺- regulated exocytosis. *Journal of Cell Biology*, 138(5), 999–1008. doi:10.1083/jcb.138.5.999
- Bloom, G. S., & Endow, S. A. (1995). Motor proteins 1: kinesins. *Protein Profile*, 2(10), 1105–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8542443>
- Boyer, P. D., Cross, R. L., & Momsen, W. (1973). A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(10), 2837–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=427120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Breidbach, O. & Kutsch, W. (1995). *The nervous systems of invertebrates: an evolutionary and comparative approach..* Basel: Birkhauser
- Brighton, C. T., & Hunt, R. M. (1978). The role of mitochondria in growth plate calcification as demonstrated in a rachitic model. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 60(5), 630–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/681381>
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S.-S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 287(4), C817–33. doi:10.1152/ajpcell.00139.2004
- Brown, G. L., Ebert, M. H., Goyer, P. F., Jimerson, D. C., Klein, W. J., Bunney, W. E., & Goodwin, F. K. (1982). Aggression, suicide, and serotonin: relationships to CSF amine metabolites. *The American Journal of Psychiatry*, 139(6), 741–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6177256>
- Brown, G. L., Goodwin, F. K., Ballenger, J. C., Goyer, P. F., & Major, L. F. (1979). Aggression in humans correlates with cerebrospinal fluid amine metabolites. *Psychiatry Research*, 1(2), 131–139. doi:10.1016/0165-1781(79)90053-2
- Brusca, R & Brusca G. (2003). *Invertebrates*. 2nd ed. Sinauer. Sunderland, MA.
- Bunin, M. a, & Wightman, R. M. (1998). Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(13), 4854–4860.
- Campbell, N., Jane B., & Lawrence G. (1999). *Biology*. 5th ed. New York: Benjamin Cummings.
- Caricati-Neto, A., Padín, J.-F., Silva-Junior, E.-D., Fernández-Morales, J.-C., de Diego, A.-M. G., Jurkiewicz, A., & García, A. G. (2013a). Novel features on the regulation by mitochondria of calcium and secretion transients in chromaffin cells challenged with acetylcholine at 37°C. *Physiological Reports*, 1(7), n/a–n/a. doi:10.1002/phy2.182
- Caricati-Neto, A., Padín, J.-F., Silva-Junior, E.-D., Fernández-Morales, J.-C., de Diego, A.-M. G., Jurkiewicz, A., & García, A. G. (2013b). Novel features on the regulation by mitochondria of calcium and secretion transients in chromaffin cells challenged with acetylcholine at 37°C. *Physiological Reports*, 1(7), e00182. doi:10.1002/phy2.182

- Carrasco-Pozo, C., Pastene, E., Vergara, C., Zapata, M., Sandoval, C., & Gotteland, M. (2012). Stimulation of cytosolic and mitochondrial calcium mobilization by indomethacin in Caco-2 cells: modulation by the polyphenols quercetin, resveratrol and rutin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(12), 2052–61. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.015
- Carretta, M. (1988). The Retzius cells in the leech: a review of their properties and synaptic connections. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, 91(3), 405–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2906825>
- Chen, G., Racay, P., Bichet, S., Celio, M. R., Eggli, P., & Schwaller, B. (2006). Deficiency in parvalbumin, but not in calbindin D-28k upregulates mitochondrial volume and decreases smooth endoplasmic reticulum surface selectively in a peripheral, subplasmalemmal region in the soma of Purkinje cells. *Neuroscience*, 142(1), 97–105. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.06.008
- Chen, J.-Q., Cammarata, P. R., Baines, C. P., & Yager, J. D. (2009). Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(10), 1540–70. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.06.001
- Coggeshall, R. E., & Fawcett, D. W. (1964). The fine structure of the central nervous system of the leech, *Hirudo medicinalis*. *Journal of Neurophysiology*, 27, 229–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14129772>
- Csordás, G., Golenár, T., Seifert, E. L., Kamer, K. J., Sancak, Y., Perocchi, F., ... Hajnóczky, G. (2013). MICU1 Controls Both the Threshold and Cooperative Activation of the Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter. *Cell Metabolism*, 17(6), 976–987. doi:10.1016/j.cmet.2013.04.020
- De Jesús García-Rivas, G., Guerrero-Hernández, A., Guerrero-Serna, G., Rodríguez-Zavala, J. S., & Zazueta, C. (2005). Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru360) prevents from irreversible injury in postischemic rat heart. *The FEBS Journal*, 272(13), 3477–88. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04771.x
- De Kock, C. P. J., Cornelisse, L. N., Burnashev, N., Lodder, J. C., Timmerman, a J., Couey, J. J., ... Brussaard, a B. (2006). NMDA receptors trigger neurosecretion of 5-HT within dorsal raphe nucleus of the rat in the absence of action potential firing. *The Journal of Physiology*, 577(Pt 3), 891–905. doi:10.1113/jphysiol.2006.115311
- Deemyad, T., Metzen, M. G., Pan, Y., & Chacron, M. J. (2013). Serotonin selectively enhances perception and sensory neural responses to stimuli generated by same-sex conspecifics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), 19609–14. doi:10.1073/pnas.1314008110
- De-Miguel, F. F., & Fuxe, K. (2012). Extrasynaptic neurotransmission as a way of modulating neuronal functions. *Frontiers in Physiology*, 3, 16. doi:10.3389/fphys.2012.00016
- De-Miguel FF, & Nicholls JG. 2015 Release of chemical transmitters from cell bodies and dendrites of nerve cells. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370: 20140181. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0181>
- De-Miguel, F. F., Santamaría-Holek, I., Noguez, P., Bustos, C., Hernández-Lemus, E., & Rubí, J. M. (2012). Biophysics of active vesicle transport, an intermediate step that couples excitation and exocytosis of serotonin in the neuronal soma. *PloS One*, 7(10), e45454. doi:10.1371/journal.pone.0045454

- De-Miguel, F. F., & Trueta, C. (2005). Synaptic and extrasynaptic secretion of serotonin. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(2), 297–312. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16047543>
- Erickson, J. T., Shafer, G., Rossetti, M. D., Wilson, C. G., & Deneris, E. S. (2007). Arrest of 5HT neuron differentiation delays respiratory maturation and impairs neonatal homeostatic responses to environmental challenges. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 159(1), 85–101. doi:10.1016/j.resp.2007.06.002
- Fingerman M., Hanumante M. M. and Fingerman S. W. (1981) The effects of biogenic amines on colour changes of the fiddler crab, *Uca pugilator*: further evidence for roles of 5-hydroxytryptamine and dopamine as neurotransmitters triggering release of erythroporphotropic hormones. *Comp. Biochem. Physiol.* 68, 205-211.
- Fuxe, K., Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Diaz-Cabiale, Z., Rivera, A., Ferraro, L., ... Agnati, L. F. (2012). Extrasynaptic neurotransmission in the modulation of brain function. Focus on the striatal neuronal-glia networks. *Frontiers in Physiology*, 3 JUN(June), 1–17. doi:10.3389/fphys.2012.00136
- García, A. G., García-De-Diego, A. M., Gandía, L., Borges, R., & García-Sancho, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiological Reviews*, 86(4), 1093–131. doi:10.1152/physrev.00039.2005
- García-Rivas, G. D. J., Carvajal, K., Correa, F., & Zazueta, C. (2006). Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. *British Journal of Pharmacology*, 149(7), 829–37. doi:10.1038/sj.bjp.0706932
- García-Sancho, J., de Diego, A. M. G., & García, A. G. (2012). Mitochondria and chromaffin cell function. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 464(1), 33–41. doi:10.1007/s00424-012-1074-2
- Giovannucci, D. R., Hlubek, M. D., & Stuenkel, E. L. (1999). Mitochondria Regulate the Ca²⁺-Exocytosis Relationship of Bovine Adrenal Chromaffin Cells. *J. Neurosci.*, 19(21), 9261–9270. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/19/21/9261.long>
- Goldstein, L. S. (1993). With apologies to Scheherazade: tails of 1001 kinesin motors. *Annual Review of Genetics*, 27, 319–51. doi:10.1146/annurev.ge.27.120193.001535
- Green, D. R. (1998). Apoptotic Pathways. *Cell*, 94(6), 695–698. doi:10.1016/S0092-8674(00)81728-6
- Gunter, T. E., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R., & Gunter, K. (2000). Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium*, 28(5-6), 285–96. doi:10.1054/ceca.2000.0168
- Gunter, T. E., & Pfeiffer, D. R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *The American Journal of Physiology*, 258(5 Pt 1), C755–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2185657>
- Gunter, T. E., & Sheu, S.-S. (2009). Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca²⁺ transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(11), 1291–1308. doi:10.1016/j.bbabi.2008.12.011

- Gunter, T. E., Yule, D. I., Gunter, K. K., Eliseev, R. a, & Salter, J. D. (2004). Calcium and mitochondria. *FEBS Letters*, *567*(1), 96–102. doi:10.1016/j.febslet.2004.03.071
- Günzel, D., Zimmermann, F., Durry, S., & Schlue, W. R. (2001). Apparent intracellular Mg²⁺ buffering in neurons of the leech *Hirudo medicinalis*. *Biophysical Journal*, *80*(3), 1298–310. doi:10.1016/S0006-3495(01)76104-8
- Hajnóczky, G., Csordás, G., Das, S., Garcia-Perez, C., Saotome, M., Sinha Roy, S., & Yi, M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium*, *40*(5-6), 553–60. doi:10.1016/j.ceca.2006.08.016
- Hamel, E. (2007). Serotonin and migraine: biology and clinical implications. *Cephalalgia: An International Journal of Headache*, *27*(11), 1293–300. doi:10.1111/j.1468-2982.2007.01476.x
- Hariri, A. R., & Holmes, A. (2006). Genetics of emotional regulation: the role of the serotonin transporter in neural function. *Trends in Cognitive Sciences*, *10*(4), 182–191. doi:10.1016/j.tics.2006.02.011
- Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., & Su, T.-P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends in Cell Biology*, *19*(2), 81–8. doi:10.1016/j.tcb.2008.12.002
- Héry, F., & Ternaux, J. P. (1981). Regulation of release processes in central serotonergic neurons. *Journal de Physiologie*, *77*(2-3), 287–301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6457140>
- Hirasawa H, Contini M & Raviola E.(2015) Extrasynaptic release of GABA and dopamine by retinal dopaminergic neurons. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370, 20140186. doi:10.1098/rstb.2014.0186
- Hodges, M. R., Tattersall, G. J., Harris, M. B., McEvoy, S. D., Richerson, D. N., Deneris, E. S., ... Richerson, G. B. (2008). Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(10), 2495–505. doi:10.1523/JNEUROSCI.4729-07.2008
- Huang, H.-P., Wang, S.-R., Yao, W., Zhang, C., Zhou, Y., Chen, X.-W., ... Zhou, Z. (2007). Long latency of evoked quantal transmitter release from somata of locus coeruleus neurons in rat pontine slices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(4), 1401–1406. doi:10.1073/pnas.0608897104
- Iravani, M. M., & Kruk, Z. L. (1997). Real-time measurement of stimulated 5-hydroxytryptamine release in rat substantia nigra pars reticulata brain slices. *Synapse (New York, N.Y.)*, *25*(1), 93–102. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(199701)25:1<93::AID-SYN11>3.0.CO;2-#
- Jahnsen, J. K. S., & Nicholls, J. G. (1972). Regeneration and changes in synaptic connections between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *69*, 639–639.
- Jann, M. W., & Slade, J. H. (2007). Antidepressant agents for the treatment of chronic pain and depression. *Pharmacotherapy*, *27*(11), 1571–87. doi:10.1592/phco.27.11.1571
- Kalckar, H. M. (1974). Origins of the concept oxidative phosphorylation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *5*(1-2), 55–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4279328>

- Kandel, E., Schwatz, J. & Jessel .T. (2012). *Principles of neural science*. 5th ed. Appleton and Lange: McGraw Hill. pp. 338–343.
- Kaushalya, S. K., Desai, R., Arumugam, S., Ghosh, H., Balaji, J., & Maiti, S. (2008). Three-photon microscopy shows that somatic release can be a quantitatively significant component of serotonergic neurotransmission in the mammalian brain. *Journal of Neuroscience Research*, 86(15), 3469–80. doi:10.1002/jnr.21794
- Kent, G., & Carr, R. (2001). *Comparative Anatomy of the Vertebrates*. 9th ed. New York: McGraw-Hill
- Kéreveur, A., Callebort, J., Humbert, M., Hervé, P., Simonneau, G., Launay, J. M., & Drouet, L. (2000). High plasma serotonin levels in primary pulmonary hypertension. Effect of long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(10), 2233–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11031209>
- Kim, H. J., Koo, S. Y., Ahn, B.-H., Park, O., Park, D. H., Seo, D. O., ... Kim, S. H. (2010). NecroX as a novel class of mitochondrial reactive oxygen species and ONOO⁻ scavenger. *Archives of Pharmacal Research*, 33(11), 1813–23. doi:10.1007/s12272-010-1114-4
- Klinge, C. M. (2008). Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(6), 1342–51. doi:10.1002/jcb.21936
- Kravitz, E. A. (2000). Serotonin and aggression: insights gained from a lobster model system and speculations on the role of amine neurons in a complex behavior. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 186(3), 221–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10757238>
- Kravitz E. A., Glusman S., Harris-Warrick R. M., Livingstone M. S., Schwarz T. S. and Goy M. F. (1980) Amines and a peptide as neurohormones in lobsters: actions on neuromuscular preparations and preliminary behaviour studies. *J. exp. Biol.* 89, 159-175.
- Kristan, W. B., Calabrese, R. L., & Friesen, W. O. (2005). Neuronal control of leech behavior. *Progress in Neurobiology*, 76(5), 279–327. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.09.004
- Kuffler, D. P., Nicholls, J., & Drapeau, P. (1987). Transmitter localization and vesicle turnover at a serotonergic synapse between identified leech neurons in culture. *The Journal of Comparative Neurology*, 256(4), 516–26. doi:10.1002/cne.902560404
- Kuffler, S. W., & Nicholls, J. G. (1966). The physiology of neuroglial cells. *Ergebnisse Der Physiologie, Biologischen Chemie Und Experimentellen Pharmakologie*, 57, 1–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5330861>
- Langer, C., Piper, C., Vogt, J., Heintze, J., Butz, T., Lindner, O., ... Horstkotte, D. (2007). Atrial fibrillation in carcinoid heart disease: The role of serotonin. A review of the literature. *Clinical Research in Cardiology: Official Journal of the German Cardiac Society*, 96(2), 114–8. doi:10.1007/s00392-006-0463-y
- Le Marrec-Croq, F., Drago, F., Vizioli, J., Sautière, P.-E., & Lefebvre, C. (2013). The leech nervous system: a valuable model to study the microglia involvement in regenerative processes. *Clinical & Developmental Immunology*, 2013, 274019. doi:10.1155/2013/274019

- Leake, L. D. (1986). Leech Retzius cells and 5-hydroxytryptamine. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*, 83(2), 229–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2871982>
- Leiser, S. C., Li, Y., Pehrson, A. L., Dale, E., Smagin, G., & Sanchez, C. (2015). Serotonergic regulation of prefrontal cortical circuitries involved in cognitive processing: A review of individual 5-HT receptor mechanisms and concerted effects of 5-HT receptors exemplified by the multimodal antidepressant vortioxetine. *ACS Chemical Neuroscience*, 150306121119004. doi:10.1021/cn500340j
- Lent, C. M. (1973). Retzius cells: neuroeffectors controlling mucus release by the leech. *Science (New York, N.Y.)*, 179(4074), 693–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4685041>
- Lent, C. M., & Dickinson, M. H. (1987). On the termination of ingestive behaviour by the medicinal leech. *The Journal of Experimental Biology*, 131, 1–15.
- Leon-Pinzon, C., Cercós, M. G., Noguez, P., Trueta, C., & De-Miguel, F. F. (2014). Exocytosis of serotonin from the neuronal soma is sustained by a serotonin and calcium-dependent feedback loop. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 169. doi:10.3389/fncel.2014.00169
- Lessmann, V., & Dietzel, I. D. (1991). Development of serotonin-induced ion currents in identified embryonic Retzius cells from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*). *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(3), 800–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1705969>
- Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D. J., Tian, Y., Jochum, W., ... Clavien, P.-A. (2006). Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5770), 104–7. doi:10.1126/science.1123842
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(1), 19. doi:10.1186/1756-8722-6-19
- Linzey, D. (2001). *Vertebrate Biology*. Boston: McGraw-Hill.
- Linnoila, M., Virkkunen, M., Scheinin, M., Nuutila, A., Rimon, R., & Goodwin, F. K. (1983). Low cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid concentration differentiates impulsive from nonimpulsive violent behavior. *Life Sciences*, 33(26), 2609–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6198573>
- Lucki, I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological Psychiatry*, 44, 151–162. doi:10.1016/S0006-3223(98)00139-5
- Ludwig M, Sabatier N, Bull PM, Landgraf R, Dayanithi G, & Leng G (2002) Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature* 418:85–89.
- Marcos, E., Adnot, S., Pham, M. H., Nosjean, A., Raffestin, B., Hamon, M., & Eddahibi, S. (2003). Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168(4), 487–93. doi:10.1164/rccm.200210-1212OC

- Marshall, A. M., Hernandez, L. L., & Horseman, N. D. (2014). Serotonin and serotonin transport in the regulation of lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 19(1), 139–46. doi:10.1007/s10911-013-9304-6
- Matlib, M. A., Zhou, Z., Knight, S., Ahmed, S., Choi, K. M., Krause-bauer, J., ... Soc, J. A. C. (1998). Oxygen-bridged Dinuclear Ruthenium Amine Complex Specifically Inhibits Ca²⁺ Uptake into Mitochondria in Vitro and in Situ in Single Cardiac Myocytes * chemical structure as Ru360 reported previously (Emer-. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10223–10231.
- Matsuda, M., Imaoka, T., Vomachka, A. J., Gudelsky, G. A., Hou, Z., Mistry, M., ... Horseman, N. D. (2004). Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Developmental Cell*, 6(2), 193–203. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14960274>
- McBride, H. M., Neuspiel, M., & Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current Biology: CB*, 16(14), R551–60. doi:10.1016/j.cub.2006.06.054
- McEntee, W., & Crook, T. (1991). Serotonin, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology*, 103(2), 143–149. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02244194>
- Mengod, G., Vilaro, M., & Cortes, R. (2007). *Chemical neuroanatomy of 5-HT receptor subtypes in the mammalian brain. The Serotonin Receptors: From Molecular Pharmacology to Human Therapeutics.*
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13771349>
- Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibáñez, I., Albillos, a, García, a G., ... Alvarez, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nature Cell Biology*, 2(2), 57–61.
- Monti, J. M. (2011). Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews*, 15(4), 269–81. doi:10.1016/j.smr.2010.11.003
- Muller, K. Nicholls, J. & Sent. G. (1981). *Neurobiology of the leech*. New York: Cold Spring Laboratory.
- Nassel'D. R., Hagberg M. and Seyan H. S. (1983) A new, possibly serotonergic, neuron in the lamina of the blowfly optic lobe: an immunocytochemical and Golgi-EM study. *Brain Res.* 280, 361-367.
- Ni, W., & Watts, S. W. (2006). 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 33(7), 575–83. doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04410.x
- Nicholls, J. G., & Baylor, D. a. (1968). Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. *Journal of Neurophysiology*, 31, 740–756.
- Nicholls JG, eds. (2001) From neuron to brain, 4th ed. Sinderland, ; Mass: Sinaues Associates

- Núñez, L., Senovilla, L., Sanz-Blasco, S., Chamero, P., Alonso, M. T., Villalobos, C., & García-Sancho, J. (2007). Bioluminescence imaging of mitochondrial Ca²⁺ dynamics in soma and neurites of individual adult mouse sympathetic neurons. *The Journal of Physiology*, *580*(2), 385–395. doi:10.1113/jphysiol.2006.126524
- Ohara-Imaizumi, M., Kim, H., Yoshida, M., Fujiwara, T., Aoyagi, K., Toyofuku, Y., ... Nagamatsu, S. (2013). Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic cells during pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(48), 19420–19425. doi:10.1073/pnas.1310953110
- Oropeza, M. V., Ponce Monter, H., Reynoso Isla, M., & Campos, M. G. (2000). The ovarian and cervical regions of the rat uterus display a different contractile response to serotonin and prostaglandin F₂alpha. I. The estrous cycle. *Life Sciences*, *66*(25), PL345–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10894093>
- Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., & Lechleiter, J. D. (2009). Chemical Calcium Indicators, *46*(3), 143–151. doi:10.1016/j.ymeth.2008.09.025.Chemical
- Patel, J. C., Witkovsky, P., Avshalumov, M. V., & Rice, M. E. (2009). Mobilization of Calcium from Intracellular Stores Facilitates Somatodendritic Dopamine Release. *Journal of Neuroscience*, *29*(20), 6568–6579. doi:10.1523/JNEUROSCI.0181-09.2009
- Patron, M., Raffaello, A., Granatiero, V., Tosatto, A., Merli, G., De Stefani, D., ... Rizzuto, R. (2013). The mitochondrial calcium uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(15), 10750–8. doi:10.1074/jbc.R112.420752
- Pavón, N., Martínez-Abundis, E., Hernández, L., Gallardo-Pérez, J. C., Alvarez-Delgado, C., Cerbón, M., ... Chávez, E. (2012). Sexual hormones: effects on cardiac and mitochondrial activity after ischemia-reperfusion in adult rats. Gender difference. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *132*(1-2), 135–46. doi:10.1016/j.jsbmb.2012.05.003
- Phillis J. W. (1966) Regulation of rectal movements in *Tapes watlingi*. *Comp. Biochem. Physiol.* *17*, 909-928.
- Rahman M. S., Mettrick D. F. and Podesta R. B. (1983) Effect of 5-hydroxytryptamine on carbohydrate metabolism in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Can. J. Physiol. Pharmac.* *61*, 137-143.
- Rossier, M. F. (2006). T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria. *Cell Calcium*, *40*(2), 155–64. doi:10.1016/j.ceca.2006.04.020
- Sarkar, B., Das, A. K., Arumugam, S., Kaushalya, S. K., Bandyopadhyay, A., Balaji, J., & Maiti, S. (2012). The Dynamics of Somatic Exocytosis in Monoaminergic Neurons. *Frontiers in Physiology*, *3*. doi:10.3389/fphys.2012.00414
- Slater, E. C. (1953). Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. *Nature*, *172*(4387), 975–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13111237>
- Soliman S. (1983) Pharmacological control of ciliary activity in the young sea urchin larva, effects of monoaminergic agents. *Comp. Biochem. Physiol.* *76*, 181-191.
- Sudhof TC. 2012 The presynaptic active zone. *Neuron* *75*, 11–25. doi:10.1016/j.neuron.2012.06.012

- Thayer, S. A., & Miller, R. J. (1990). Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *The Journal of Physiology*, 425, 85–115. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1189839&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- To, M. S., Aromataris, E. C., Castro, J., Roberts, M. L., Barritt, G. J., & Rychkov, G. Y. (2010). Mitochondrial uncoupler FCCP activates proton conductance but does not block store-operated Ca²⁺ current in liver cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 495, 152–158. doi:10.1016/j.abb.2010.01.004
- Toneby M. (1977) Determination of 5-hydroxytryptamine in early echinoderm embryos. *Camp. Biochem. Physiol.* 58, 77-83.
- Traaseth, N., Elfering, S., Solien, J., Haynes, V., & Giulivi, C. (2004). Role of calcium signaling in the activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1658(1-2), 64–71. doi:10.1016/j.bbabbio.2004.04.015
- Trueta, C., Kuffler, D. P., & De-Miguel, F. F. (2012). Cycling of dense core vesicles involved in somatic exocytosis of serotonin by leech neurons. *Frontiers in Physiology*, 3, 175. doi:10.3389/fphys.2012.00175
- Trueta, C., Méndez, B., & De-Miguel, F. F. (2003). Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurones. *The Journal of Physiology*, 547, 405–416. doi:10.1113/jphysiol.2002.030684
- Trueta, C., Sánchez-Armass, S., Morales, M. A., & De-Miguel, F. F. (2004). Calcium-induced calcium release contributes to somatic secretion of serotonin in leech Retzius neurons. *Journal of Neurobiology*, 61(3), 309–316. doi:10.1002/neu.20055
- Twarog B. M. and Cole R. A. (1972) Relaxation of catch in a molluscan smooth muscle. III. Effects of serotonin, dopamine and related compounds. *Camp. Biochem. Physiol.* 43, 331-335.
- Uphouse, L. (2014). Pharmacology of serotonin and female sexual behavior. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 121, 31–42. doi:10.1016/j.pbb.2013.11.008
- Vanden Berghe, P. (2004). Fluorescent molecules as tools to study Ca²⁺ signaling, mitochondrial dynamics and synaptic function in enteric neurons. *Verhandelingen - Koninklijke Academie Voor Geneeskunde van België*, 66(5-6), 407–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15641568>
- Wabnitz R. W. and von Wachtendonk D. (1976) Evidence for serotonin (5-hydroxytryptamine) as transmitter in the penis retractor muscle of *Helix pomatia*. *Experientia* 32, 707-709.
- Yang, J. T., Saxton, W. M., Stewart, R. J., Raff, E. C., & Goldstein, L. S. (1990). Evidence that the head of kinesin is sufficient for force generation and motility in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4964), 42–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2142332>