



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**SECRECIÓN EXTRASINÁPTICA DE SEROTONINA A PARTIR DE
DIFERENTES POZAS DE VESÍCULAS EN EL AXÓN NEURONAL**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

MONTSERRAT GUERRERO CERCÓS

TUTORA PRINCIPAL

DRA. CITLALI TRUETA SEGOVIA

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ

FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2018



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.

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
Secreción de serotonina	7
Liberación sináptica de serotonina.	8
Liberación extrasináptica de serotonina.	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
HIPÓTESIS GENERAL	13
HIPÓTESIS PARTICULARES	13
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS PARTICULARES	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Sistema nervioso de sanguijuela.	15
Aislamiento y cultivo neuronal.	17
Registro intracelular.	18
Determinaciones de la exocitosis.	19
Microscopía electrónica	20
Amperometría.	20
Mediciones de calcio intracelular.	20
Imágenes de fluorescencia.	21
Análisis de las imágenes.	22
Mediciones de la remoción de calcio	22
Tratamientos farmacológicos.	23
RESULTADOS	24
Cinética de la exocitosis axonal.	24
Transitorios de Ca^{2+} y la exocitosis.	27
Características del transitorio lento de Ca^{2+} a distintas frecuencias de estimulación y su contribución en la exocitosis.	29
Características del transitorio rápido de Ca^{2+} a distintas frecuencias de estimulación.	33
Participación de la liberación de calcio inducida por calcio en el transitorio rápido de Ca^{2+} .	37
Participación de los canales de calcio tipo L en el transitorio rápido de Ca^{2+} .	42
Contribución de las distintas fuentes de Ca^{2+} en la exocitosis.	45
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	57
APÉNDICE	58
REFERENCIAS	73

Resumen

A pesar del pequeño número de neuronas serotoninérgicas que hay en el sistema nervioso, la serotonina regula una gran variedad de funciones, desde los patrones motores rítmicos asociados a la locomoción y la respiración, hasta funciones complejas como la atención y las emociones. Esto es posible gracias a que las neuronas serotoninérgicas secretan serotonina de manera independiente y finamente regulada a partir de distintos sitios de la neurona.

La secreción de serotonina en la sinapsis ocurre rápidamente en respuesta a la actividad eléctrica a bajas frecuencias, y produce efectos locales, mientras que la secreción extrasináptica en el soma o las dendritas es muy lenta, requiere de actividad eléctrica a frecuencias altas y tiene efectos paracrinos difusos. Por otro lado, los axones de las neuronas serotoninérgicas tienen grupos de vesículas en sitios que morfológicamente parecen ser de secreción, en ausencia de contrapartes postsinápticas. La secreción extrasináptica en los axones podría ser la principal fuente de modulación serotoninérgica en circuitos neuronales locales, pero no ha sido demostrada funcionalmente ni se han estudiado los mecanismos que la regulan.

En este trabajo estudiamos la secreción extrasináptica de serotonina en el axón, su dependencia de la actividad eléctrica y de diferentes fuentes de calcio en neuronas serotoninérgicas de Retzius aisladas del sistema nervioso central de la sanguijuela.

Estimulamos la secreción, en neuronas de Retzius en cultivo, con electrodos intracelulares produciendo secuencias de 10 impulsos a 1 Hz, que evocan secreción sináptica ó a 20 Hz que evocan secreción somática y cuantificamos la exocitosis y la dinámica del calcio citoplasmático midiendo incrementos en la fluorescencia de los colorantes FM1-43 y Fluo-4 respectivamente, tanto con epifluorescencia como con microscopía confocal.

Cada impulso a 1 Hz produjo un incremento rápido y transitorio del calcio en áreas cercanas a la membrana. Después de la actividad eléctrica ocurrió otro incremento lento y una fase secretora que duró 71.11 ± 7.42 s. Durante la estimulación con diez impulsos a 20 Hz ocurrió un incremento transitorio rápido de calcio que alcanzó el interior del axón. Posteriormente ocurrió un incremento lento en áreas cercanas a la membrana, y dos fases secretoras: una con cinética similar a la producida a 1 Hz, pero de mayor amplitud, y otra retardada que extendió la duración de la secreción a 281.60 ± 11.19 s, sugiriendo secreción desde distintas pozas vesiculares gradualmente más alejadas de la membrana plasmática.

El bloqueo de la liberación de calcio intracelular con una combinación de rianodina y tapsigargina acortó la secreción, restringiéndola a la duración del transitorio rápido de calcio a ambas frecuencias (36.69 ± 1.76 s). En neuronas estimuladas a 20 Hz este bloqueo disminuyó la amplitud del transitorio rápido de calcio en 54.58 ± 4.2 %, restringiéndolo a regiones cercanas a la membrana, y abolió tanto el transitorio de calcio lento como la segunda fase secretora, revelando su dependencia de la liberación de calcio intracelular.

Al bloquear los canales de calcio tipo L con nimodipina se redujo el transitorio de calcio durante un tren a 20 Hz en 38.41 ± 4.28 %, sin afectarse su propagación y disminuyó la amplitud de la segunda fase secretora en un 64.14 ± 3.84 %, sin bloquearla. Esto muestra que la fuente de calcio más importante para la secreción en el axón son los depósitos intracelulares y no los canales tipo L, como en otros sitios de secreción extrasináptica y sugiere que la entrada de calcio por otros tipos de canales, posiblemente sinápticos, también activa esta fuente de calcio.

La secreción extrasináptica axonal de serotonina muestra mecanismos intermedios entre la secreción sináptica y la somática y podría producir la modulación paracrina de circuitos neuronales de forma más rápida y localizada que la secreción somática, expandiendo las posibilidades de comunicación de una sola neurona serotoninérgica. Esta complejidad permite que pocas neuronas regulen múltiples funciones en distintas regiones del sistema nervioso de manera diferencial.

Introducción

La serotonina es un neurotransmisor que regula una gran cantidad de funciones fisiológicas, desde funciones básicas como la ingestión de alimentos (Breisch et al., 1976; Saller and Stricker, 1976), los ritmos circadianos (Prosser et al., 1990), y la generación de patrones motores (Jacobs and Fornal, 1993; McCall and Aghajanian, 1979; Weiger, 1997; White et al., 1996) hasta funciones complejas como el aprendizaje (Byrne et al., 1991; Ehrlich et al., 1992; Klein et al., 1980; Sahley, 1994), el sueño y la atención (Jacobs and Azmitia, 1992). La serotonina regula también varias conductas entre las que destacan la conducta social (Harris-Warrick and Kravitz, 1984; Kravitz, 2000; Raleigh et al., 1991), y la sexual (Hull et al., 1999).

En los humanos, las alteraciones en el sistema serotoninérgico se han asociado con varios desórdenes conductuales y trastornos neurológicos como la depresión (Arango et al., 2002), la esquizofrenia (Brieden et al., 2002), la epilepsia (Jobe et al., 1999), la ansiedad (Jenike et al., 1996) así como con trastornos alimenticios como la anorexia nerviosa (Frazer y Hensler, 1994). Por ello, estudiar cómo se regula la liberación de serotonina en el sistema nervioso podría contribuir a desarrollar tratamientos para este tipo de patologías.

Las funciones de la serotonina están altamente conservadas a lo largo de la escala filogenética. Por ejemplo, la regulación de la alimentación se observa desde invertebrados como la sanguijuela, donde la serotonina regula la ingesta mediante la regulación directa de las glándulas salivales, las mandíbulas y la faringe (Lent, 1973), hasta los mamíferos, donde el incremento de serotonina intraventricular disminuye la ingesta de alimentos (Breisch et al., 1976; Saller and Stricker, 1976). De igual manera la regulación de la conducta social se observa desde invertebrados como los crustáceos, donde los niveles de serotonina determinan la conducta agresiva asociada con la dominancia social (Harris-Warrick and Kravitz, 1984; Kravitz, 2000), hasta los primates, donde regula la conducta social en todo su espectro, desde la agresión hasta la depresión (Raleigh et al., 1991).

Gracias a la accesibilidad que hay en el sistema nervioso de los invertebrados para estudiar los circuitos neuronales al nivel celular, sabemos que en los crustáceos la serotonina modula cada etapa de los circuitos que regulan las conductas sociales, desde las entradas sensoriales hasta las respuestas motoras (para revisión ver Kravitz, 2000). Cabe mencionar que los mecanismos de liberación de serotonina en terminales sinápticas se conocen en su mayoría a partir de estudios en una sinapsis entre neuronas de sanguijuela (para revisión, ver (De-Miguel and Trueta, 2005a; Fernández-de-Miguel and Drapeau, 1995).

Una característica remarcable de los sistemas serotoninérgicos es que el número de neuronas serotoninérgicas es pequeño comparado con el total de neuronas en el sistema nervioso. Por ejemplo, en la sanguijuela hay 7 neuronas serotoninérgicas de 400 en total en cada ganglio segmental, en los roedores hay únicamente 9,000 neuronas serotoninérgicas de un total de 10^7 neuronas en el sistema nervioso central, y en el ser humano la proporción de neuronas serotoninérgicas es de sólo una por cada millón de neuronas en el sistema nervioso. En los mamíferos los somas de las neuronas serotoninérgicas se encuentran en los núcleos del raphé (Dahlström and Fuxe, 1964); sin embargo, sus axones inervan prácticamente todas las áreas del sistema nervioso central y constituyen unos de los sistemas anatómicos y funcionales más complejos y extensos del cerebro.

Esto, sumado a la gran diversidad de funciones de la serotonina, permite suponer que la actividad de las neuronas serotoninérgicas debe estar finamente regulada y que la liberación de serotonina posiblemente es regulada de manera diferencial en distintos sitios del sistema nervioso. Muchas de las funciones de la serotonina se ejercen a través de efectos lentos y de larga duración, que son asociados preferentemente con la modulación paracrina de circuitos neuronales enteros que con la transmisión sináptica, que es rápida y muy localizada. Un ejemplo claro de esto es la regulación de la conducta social y las emociones, que son caracterizadas por cambios lentos y duraderos, que no se explican fácilmente por la liberación sináptica de neurotransmisores.

La presencia de serotonina en el fluido extracelular en concentraciones suficientes para activar a sus receptores en distintas áreas del sistema nervioso y la presencia de receptores y de transportadores de serotonina en sitios extrasinápticos de distintos tipos neuronales (Bunin and Wightman, 1999) son una sólida evidencia que apoya la idea de que la serotonina es liberada por sitios extrasinápticos y ejerce efectos paracrinos en el sistema nervioso. En efecto, además de la liberación de serotonina a partir de terminales sinápticas, se ha demostrado la liberación extrasináptica de serotonina a partir del cuerpo celular o soma de neuronas serotoninérgicas, tanto de invertebrados (Trueta et al., 2003) como de mamíferos (Kaushalya et al., 2008a). La secreción de serotonina en los axones no ha sido mostrada ni se han estudiado los mecanismos que la regulan, sin embargo la presencia de vesículas en sitios que parecen ser de secreción en ausencia de contrapartes postsinápticas sugieren que existe liberación en axón y que posiblemente es extrasináptica.

Secreción de serotonina.

Los neurotransmisores se empaquetan para su secreción en dos tipos distintos de vesículas membranales: vesículas claras pequeñas (40-60 nm de diámetro), que almacenan transmisores de bajo peso molecular, como los llamados transmisores “clásicos”, catecolaminas o indolaminas; y vesículas electrodensas grandes (90-120 nm de diámetro), que además de transmisores de bajo peso molecular generalmente almacenan péptidos. Ambos tipos vesiculares pueden coexistir en la misma neurona y contener dos o más mensajeros químicos.

Las vesículas claras liberan su contenido por lo general en la zona activa de las terminales presinápticas, produciendo efectos localizados sobre terminales postsinápticas específicas. Las vesículas electrodensas, por el contrario, liberan su contenido en sitios extrasinápticos (Hirasawa et al., 2009; Puopolo et al., 2001; Trueta and De-Miguel, 2012) en ausencia de contrapartes postsinápticas, permitiendo su difusión en el fluido extracelular, donde puede modular a poblaciones enteras de neuronas.

La serotonina se almacena tanto en vesículas claras como en vesículas electrodensas (Bruns et al., 2000; Kuffler et al., 1987) y es posible que cada tipo vesicular, al liberar en sitios distintos, produzca respuestas de distinto alcance. Dado que las vesículas electrodensas contienen 17 veces más serotonina que las claras (Bruns et al., 2000), su exocitosis libera cantidades mayores de serotonina que podrían ser responsables de una variedad de efectos paracrinos con un curso temporal más lento que los efectos sinápticos.

La mayor parte de lo que se sabe sobre la liberación de serotonina se ha estudiado en las neuronas de Retzius, identificadas en el sistema nervioso central de la sanguijuela, debido a la accesibilidad de esta preparación. Estas neuronas presentan tanto liberación sináptica a partir de vesículas claras (Dietzel et al., 1986; Fernández-de-Miguel and Drapeau, 1995; Henderson, 1983; Henderson et al., 1983; Kuffler et al., 1987) en las zonas activas de las terminales, como liberación extrasináptica a partir de vesículas electrodensas en sitios extrasinápticos como el soma (Trueta et al., 2003).

La liberación sináptica de serotonina en estas neuronas presenta los mismos mecanismos conocidos en las sinapsis de vertebrados, incluyendo los mamíferos. La liberación somática de esta amina también ha sido posteriormente demostrada en las neuronas de los núcleos del raphé en mamíferos (Kaushalya et al., 2008a; Sarkar et al., 2012), aunque los mecanismos que la regulan no se han podido estudiar con el detalle con que se han estudiado en las neuronas de Retzius, debido a que las

neuronas serotoninérgicas en los mamíferos no son tan accesibles. Por ello el estudio de los mecanismos básicos de liberación de neurotransmisores en neuronas de sanguijuela, que es mucho más accesible, es aplicable a otros animales.

Liberación sináptica de serotonina.

La exocitosis de las vesículas claras en terminales sinápticas y su regulación han sido ampliamente estudiadas en múltiples preparaciones (Catterall, 1999; Heuser et al., 1974; Katz and Miledi, 1967a, 1967b; Llinás et al., 1981, 1992; Sheng et al., 1998; Wu et al., 1999), tanto de vertebrados como de invertebrados y se conocen bastante bien. Un grupo de vesículas claras se encuentran adosadas a la membrana presináptica, formando una poza lista para liberar su contenido, mientras que otras se encuentran más alejadas, formando una poza de reserva (Pieribone et al., 1995). La liberación a partir de la poza lista para liberar se activa en respuesta a impulsos sencillos o trenes de impulsos a bajas frecuencias. Cuando un impulso llega a la terminal presináptica se abren canales de calcio dependientes de voltaje, permitiendo la entrada de calcio a la terminal y produciendo un incremento muy grande en la concentración de calcio local en microdominios cercanos a los canales (Llinás et al., 1992).

Debido a la presencia de proteínas amortiguadoras en el citoplasma que se unen al calcio y no permiten su difusión, y a ATPasas que sacan al calcio de la terminal, el incremento en la concentración de calcio ocurre en un espacio muy limitado y es breve. Las vesículas claras requieren concentraciones de calcio $>100 \mu\text{M}$ para la exocitosis (Heidelberger et al., 1994), por lo que únicamente las vesículas adosadas en la zona activa, cerca de los canales de calcio, se fusionan con la membrana y liberan su contenido en respuesta a un solo impulso, o a bajas frecuencias de estimulación. La serotonina almacenada en estas vesículas se libera directamente a la hendidura sináptica, a pocos nanómetros de distancia de los receptores postsinápticos, por lo que su efecto es muy rápido y muy localizado.

Por otro lado, la poza de reserva puede ser movilizada en respuesta a la estimulación repetitiva y pasar a la poza liberable para mantener la liberación ante la actividad eléctrica sostenida. Al menos parte de las vesículas de la poza de reserva están unidas al citoesqueleto mediante proteínas llamadas sinapsinas, que evitan que en reposo estas vesículas se movilizan hacia la membrana plasmática. Las sinapsinas son una familia de fosfoproteínas (Greengard et al., 1993a; Huttner et al., 1983) cuya región amino terminal contiene una cabeza globular hidrofóbica que se asocia con las

vesículas sinápticas. La región carboxilo terminal es una estructura elongada y básica, que se une a los filamentos de actina (Ueda and Greengard, 1977).

Las sinapsinas tienen varios sitios de fosforilación (Fiumara et al., 2004; Greengard et al., 1993b; Hilfiker et al., 2005; Sakurada et al., 2002) que son substrato de múltiples cinasas de proteínas, incluyendo las dependientes de Ca^{2+} y calmodulina (CaMK) tipos I, II y IV, la dependiente de AMP cíclico (PKA) y la activada por mitógeno (MAPK). El incremento transitorio de la concentración de Ca^{2+} en respuesta a la actividad eléctrica activa vías de señalización intracelular en las que participan estas enzimas (Chi et al., 2003), que entonces fosforilan a la sinapsina. Cuando la sinapsina es fosforilada, disminuye su afinidad por la actina y por las vesículas (Benfenati et al., 1989; Chi et al., 2003; Hosaka et al., 1999; Huttner et al., 1983; Jovanovic et al., 1996; Schiebler et al., 1986; Sihra et al., 1989), liberando a éstas de su anclaje y permitiendo su movilización. Así, las sinapsinas participan regulando la cantidad de vesículas que pasan de la poza de reserva a la poza liberable en respuesta a la actividad eléctrica repetitiva.

Liberación extrasináptica de serotonina.

La liberación extrasináptica se ha estudiado mayormente en células endocrinas excitables y en el soma de algunas neuronas, ocurre principalmente a partir de vesículas electrodensas que generalmente se encuentran localizadas más alejadas de la membrana plasmática (Bruns et al., 2000; Kuffler et al., 1987; van Weering et al., y 2008) liberan su contenido en sitios extrasinápticos en ausencia de contrapartes postsinápticas, donde el transmisor tiene que difundir una distancia mayor para llegar a receptores en células vecinas o lejanas, ejerciendo efectos parácrinos. Sin embargo, los mecanismos de liberación a partir de vesículas electrodensas no se conocen tan bien como los sinápticos.

En estas preparaciones, donde sólo hay vesículas electrodensas, la secreción requiere de la estimulación a altas frecuencias (Chen et al., 1995; Heinemann et al., 1993; Jaffe et al., 1998; Trueta et al., 2003), de la activación de canales de calcio tipo L (Mansvelder and Kits, 2000; Trueta et al., 2003) y depende en parte de la liberación de calcio inducida por calcio de los depósitos intracelulares (Kang and Holz, 2003; Lemmens et al., 2001; Trueta et al., 2004).

En células cromafines la concentración de calcio intracelular necesaria para producir la exocitosis a partir de vesículas electrodensas es aproximadamente $5 \mu\text{M}$ (Heinemann et al., 1993), mucho menor que la que requieren las vesículas sinápticas

claras, por lo que estas vesículas pueden liberar en sitios más alejados de los canales de calcio (Mansvelter and Kits, 2000).

La exocitosis somática de serotonina se mostró por primera vez en neuronas de Retzius de la sanguijuela (Trueta et al., 2003). En reposo, las vesículas electrodensas se encuentran agrupadas en cúmulos distantes a la membrana plasmática formando tres subpoblaciones (De-Miguel et al., 2012). La población más periférica se ubica a una distancia promedio de $1.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ de la membrana plasmática, otra más interna y dispersa ubicada a $3.7 \pm 0.3 \mu\text{m}$ y la tercera que consiste en grupos de cúmulos perinucleares (De-Miguel et al., 2012; Trueta et al., 2012).

La estimulación con trenes de impulsos a bajas frecuencias (1 Hz) no produce exocitosis somática, pero trenes de impulsos a frecuencias altas (10-50 Hz) desencadenan el transporte de 80-100 cúmulos vesiculares hacia la membrana plasmática (Trueta et al., 2003, 2004, 2012). El transporte vesicular ocurre a lo largo de arreglos de microtúbulos, ya que cuando se desacoplan al utilizar colchicina se inhibe la exocitosis somática (De-Miguel et al., 2012). Este transporte a su vez es mediado por motores moleculares que van transportando a los cúmulos vesiculares a través de los rieles de microtubulos por lo que la exocitosis depende indirectamente de la síntesis de ATP (Bi et al., 1997; Visscher et al., 1999).

El Ca^{2+} que entra a la mitocondria (Balaban, 2002; Gunter et al., 2004; Hansford, 1994; Satrústegui et al., 2007) puede activar directamente a la ATP sintetasa y a la producción de NADH por deshidrogenasas sensibles a Ca^{2+} , lo que resulta en un rápido incremento en la producción de ATP (Gunter et al., 2004). En las neuronas Retzius, tanto la mitocondria, como el retículo endoplásmico se encuentran asociados a los cúmulos vesiculares (De-Miguel et al., 2012). Esta configuración ultraestructural podría favorecer la transferencia de Ca^{2+} entre el retículo endoplásmico y la mitocondria para la síntesis de ATP, que a su vez estaría activando a los motores de cinesina que participan en la movilización vesicular. El bloqueo de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria con Ru360 produce un decremento significativo en la exocitosis en el soma (Del Pozo et al., en preparación). Sin embargo, aún falta evidencia directa que confirme el mecanismo que ocurre a partir de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria y la posterior producción de ATP en respuesta a la estimulación a 20 Hz.

La secreción somática tiene una latencia de inicio de $75.4 \pm 20.3 \text{ s}$ y es sostenida durante varios minutos por un mecanismo de retroalimentación positiva en el que la serotonina liberada activa autorreceptores tipo 5-HT₂ acoplados a la enzima fosfolipasa C, produciendo liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares en el área

submembranal, lo cual permite la exocitosis de las siguientes vesículas que alcanzan la membrana, y el ciclo se repite hasta que se fusiona todo el cúmulo vesicular movilizado (Leon-Pinzon et al., 2014).

Se ha mostrado la secreción somática de prácticamente todos los neurotransmisores conocidos en una variedad de tipos neuronales, tanto de invertebrados como de vertebrados (para revisión ver Trueta and De-Miguel, 2012). A pesar de que en vertebrados los mecanismos que regulan la liberación somática no se han podido estudiar con el mismo detalle debido a la menor accesibilidad de las neuronas, las características y mecanismos que se han encontrado en los núcleos del raphé en roedores (Kaushalya et al., 2008a, 2008b; Sarkar et al., 2012) son similares a los encontrados en las neuronas de Retzius. Por ejemplo, la secreción somática ocurre a partir de vesículas electrodensas en neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus y tiene una latencia de varios cientos de milisegundos a varios segundos en estas neuronas (Huang et al., 2007), al igual que en células amacrinas de la retina (Hirasawa et al., 2009), en neuronas purinérgicas del ganglio de la raíz dorsal (Zhang et al., 2007) y en neuronas espinales de *Xenopus* (Sun and Poo, 1987), sugiriendo que las vesículas requieren ser movilizadas desde sitios distantes de la membrana plasmática. El curso temporal de la secreción somática también es de varios minutos en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra reticulata (Chen and Rice, 2001) y en neuronas serotoninérgicas de los núcleos del raphé (Kaushalya et al., 2008a). De igual forma se ha mostrado que la secreción somática en los mamíferos también depende de la actividad eléctrica a altas frecuencias o de despolarizaciones largas (Fuenzalida et al., 2011; Hirasawa et al., 2009; Huang et al., 2007; Jaffe et al., 1998; Sarkar et al., 2012; Soldo et al., 2004; Sun and Poo, 1987; Zhang et al., 2007), así como de la activación de los canales de calcio tipo L (Hirasawa et al., 2009; Puopolo et al., 2001) y de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Chen and Rice, 2001; Hua et al., 2004; Patel et al., 2009; Soldo et al., 2004). Asimismo, la liberación de neurotransmisores en mamíferos es también regulada por mecanismos de retroalimentación positiva (Ludwig and Leng, 2006).

Estos distintos modos de liberación a partir de distintos sitios en una misma neurona, permiten que la serotonina pueda tener por un lado efectos sinápticos rápidos y localizados, que se reflejan en funciones rápidas en circuitos neuronales con conexiones sinápticas fijas (como podría ocurrir en la iniciación del nado; Willard, 1981); y por otro lado efectos extrasinápticos más lentos y difusos de neuromodulación que pueden verse reflejados en funciones más lentas y sostenidas, como ocurre con el caso de las emociones.

La diferencia en la distribución espacial de las vesículas con respecto a la membrana, tiene como consecuencia diferencias en la dependencia de la frecuencia de estimulación, en la dependencia de la concentración de calcio y en el curso temporal de la liberación.

Los axones de las neuronas serotoninérgicas, tanto en vertebrados como en invertebrados tienen ramificaciones complejas que inervan prácticamente todas las áreas del sistema nervioso central. Estos axones forman algunas sinapsis, pero sobre todo tienen varicosidades que contienen vesículas claras y/o electrodensas en ausencia de contrapartes postsinápticas (Descarries and Mechawar, 2000; revisado por Bunin and Wightman, 1999), que podrían ser sitios de liberación extrasináptica.

Los axones serotoninérgicos de la región ventral de la médula espinal (Alvarez et al., 1998; Kiehn et al., 1992) o de la sustancia nigra reticulata (Moukhles et al., 1997) establecen en su mayoría contactos sinápticos bien establecidos con neuronas diana bien definidas. Sin embargo, aproximadamente el 60% de los axones de la región dorsal de la médula espinal (Ridet et al., 1993) y del núcleo accumbens (Van Bockstaele and Pickel, 1993), no forman sinapsis.

Aparentemente los axones que se originan en diferentes núcleos se pueden proyectar a una misma área en el cerebro y formar diferentes patrones de conexión. Por ejemplo, en el hipocampo, las varicosidades que provienen del raphé medial forman sinapsis directas con interneuronas (Freund and Buzsáki, 1996; Varga et al., 2009) mientras que las varicosidades que provienen del raphé dorsal es raro que formen sinapsis (Kosofsky and Molliver, 1987). Es recurrente que las colaterales axonales que terminan en el raphé dorsal contengan tanto terminales sinápticas como no sinápticas (Chazal and Ralston, 1987).

Bunin y Wightman en 1998, cuantificaron la concentración de serotonina liberada en respuesta a la estimulación en dos áreas: 1) la sustancia nigra reticulata, una región con contactos sinápticos identificados; y 2) el núcleo dorsal del raphé, una región somatodendrítica con rara incidencia sináptica. La concentración en ambas regiones fue idéntica en respuesta a estimulaciones con un solo pulso o trenes a alta frecuencia. Además estimaron el número de moléculas liberadas por terminal en la sustancia nigra reticulata, y los resultados muestran que el número de moléculas fue considerablemente menor con respecto al número de transportadores y receptores, lo cual refuerza la idea de la liberación a partir de sitios extrasinápticos (Bunin and Wightman, 1998). El hecho de que exista una concentración similar en la sustancia nigra reticulata que es una región alejada de los somas que se encuentran en los

núcleos del raphé, abre la posibilidad de que esa serotonina pueda ser liberada de sitios extrasinápticos axonales.

Planteamiento del Problema

Aunque la evidencia morfológica y la acumulación de serotonina en sitios extrasinápticos alejados de los somas sugieren que existe secreción extrasináptica axonal, ésta no ha sido directamente demostrada de manera funcional y sus características y mecanismos de regulación no han sido estudiados.

Dado que en los axones las vesículas electrodensas no están adosadas a la membrana plasmática como en las terminales presinápticas, pero tampoco están ubicadas a distancias tan grandes de la membrana como ocurre en el soma, la secreción extrasináptica axonal podría tener características intermedias entre la liberación sináptica y la somática y podría contribuir a la modulación de circuitos neuronales locales de manera más rápida que la liberación somática.

En este trabajo, mostramos que ocurre secreción extrasináptica de serotonina en el axón, y estudiamos el mecanismo que la produce, su dependencia de la frecuencia de disparo, y las fuentes de calcio involucradas en este mecanismo. Para ello utilizamos neuronas serotoninérgicas de Retzius, aisladas del sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo verbana*.

Hipótesis General:

Si en el axón de las neuronas serotoninérgicas hay vesículas electrodensas ubicadas en sitios de liberación en ausencia de contrapartes postsinápticas, podría existir liberación extrasináptica de serotonina en el axón neuronal. Dado que las vesículas en el axón no se encuentran adosadas a la membrana plasmática pero su distancia a ésta es menor que en el soma, es posible que los mecanismos que regulan la liberación axonal sean intermedios entre los sinápticos y los somáticos.

Hipótesis particulares:

1.- Si hay una población de vesículas electrodensas axonales cercana a la membrana plasmática, es posible que la liberación extrasináptica en el axón se puede activar a bajas frecuencias de estimulación.

2.- Si la liberación del contenido de vesículas electrodensas que se encuentran distantes de la membrana plasmática, requiere un factor de amplificación de la señal de calcio transmembranal, entonces esta amplificación podría ser producida por la liberación de calcio inducida por calcio de depósitos intracelulares.

3.- Si para activar la liberación de calcio de los depósitos intracelulares se necesita la acumulación y difusión del calcio transmembranal, entonces esta activación podría requerir una estimulación repetitiva a altas frecuencias.

4.- Si la estimulación a bajas frecuencias sólo produce la entrada de calcio transmembranal, entonces esta estimulación únicamente produciría la liberación del contenido de las vesículas claras y de las vesículas electrodensas cercanas a la membrana plasmática.

5.- Si la secreción extrasináptica en el axón dura más de lo que dura el incremento de calcio en respuesta a la estimulación eléctrica, entonces la secreción extrasináptica axonal podría requerir de un mecanismo de retroalimentación positiva entre la serotonina liberada y el calcio liberado de depósitos intracelulares, tal y como ocurre en el soma.

Objetivo General:

Demostrar funcionalmente que hay secreción extrasináptica en el axón de las neuronas serotoninérgicas y estudiar los mecanismos que la regulan, incluyendo su dependencia de la frecuencia de disparo, las fuentes de Ca^{2+} que participan y los mecanismos de autorregulación que ejerce la propia serotonina sobre éste tipo de liberación.

Objetivos particulares:

1.- Demostrar que hay secreción extrasináptica en el axón neuronal.

2.- Estudiar la dependencia de la frecuencia de disparo que tiene la secreción extrasináptica axonal de serotonina.

3.- Investigar la contribución de la liberación de calcio inducida por calcio en la secreción extrasináptica axonal de serotonina en función de la frecuencia de estimulación.

4.- Investigar si la duración de la secreción extrasináptica axonal depende de un mecanismo de retroalimentación positiva entre la serotonina liberada y el calcio de depósitos intracelulares, tal y como ocurre en el soma.

Materiales y Métodos.

Sistema nervioso de la sanguijuela.

En esta sección se describe este sistema nervioso con el fin de exponer las ventajas de esta preparación.

Las sanguijuelas son anélidos pertenecientes a la clase Hirudinea. Su sistema nervioso central está conformado por una cadena ganglionar con un ganglio cefálico formado por la fusión de cuatro ganglios, un ganglio caudal formado por la fusión de siete ganglios y 21 ganglios segmentales que son similares entre sí (Figura 1A), cada uno de los cuales controla un segmento del cuerpo y contiene alrededor de 400 neuronas cada uno. La mayoría de las neuronas han sido identificadas por su función, su forma, su patrón de actividad eléctrica y su localización (Nicholls and Baylor, 1968). Dentro del ganglio se encuentran los somas de las neuronas (Figura 1B) y parte de las neuritas, que forman el neuropilo.

Cada ganglio contiene 7 neuronas serotoninérgicas. Entre ellas están las dos neuronas de Retzius (Figura 1B, marcadas con una R), que son las más grandes en el ganglio. Hay también un par de neuronas dorso-laterales (DL) llamadas 21, un par de neuronas ventro-laterales (VL) llamadas 61 y una neurona más ubicada en el paquete medial posterior del ganglio (Payton, 1981). Algunas neuronas envían prolongaciones ya sea a través de las raíces laterales para inervar los órganos internos, músculos y piel y glándulas en la pared corporal, o a través de los nervios conectivos, para conectarse con neuronas en los ganglios adyacentes (Payton, 1981).

A diferencia del sistema nervioso central de los mamíferos, el de los invertebrados tiene la capacidad de regenerar después de una lesión (Baylor and Nicholls, 1971; Jansen and Nicholls, 1972). Esto ha permitido aislar neuronas individuales y mantenerlas en cultivo, en donde sobreviven por semanas, conservando sus características fisiológicas distintivas, tales como la forma de sus potenciales de acción y los transmisores que liberan. Además, si se ponen en contacto con un blanco adecuado forman sinapsis específicas (Fuchs et al., 1982).

Debido al gran tamaño y la accesibilidad de las neuronas, así como al número limitado de neuronas en sus circuitos, el sistema nervioso de muchos invertebrados ha sido de gran utilidad para el estudio del funcionamiento básico de las neuronas y sus interrelaciones. El sistema nervioso de la sanguijuela ha sido uno de los más estudiados en neurobiología y ha contribuido a entender algunos aspectos básicos del funcionamiento del sistema nervioso (ver, por ejemplo, Muller, et al., 1981).

Las ventajas del sistema nervioso de la sanguijuela para estudios de neurobiología provienen del número relativamente pequeño de neuronas que controlan cada función, de sus ganglios estereotipados, de los claros pasos que sigue en su desarrollo, de la capacidad de regeneración y del repertorio limitado de comportamientos que presenta (Blackshaw et al., 1982). Cada neurona se repite de un ganglio a otro, de un espécimen a otro, e incluso entre distintas especies. Las neuronas tienen somas con diámetros de entre 10 y 80 μm , lo cual facilita realizar registros electrofisiológicos en ellos.

En la sanguijuela se ha estudiado extensivamente el desarrollo del sistema nervioso central, la formación y el funcionamiento de las sinapsis serotoninérgicas (Fernández-de-Miguel and Drapeau, 1995), la regeneración del sistema nervioso después de una lesión (Nicholls, 1987), el funcionamiento de las neuronas y de los receptores mecanosensoriales, así como los mecanismos finos de liberación sináptica y extrasináptica a partir de soma de neuronas serotoninérgicas (para revisión vea (De-Miguel and Trueta, 2005a), entre otros temas de neurofisiología básica.

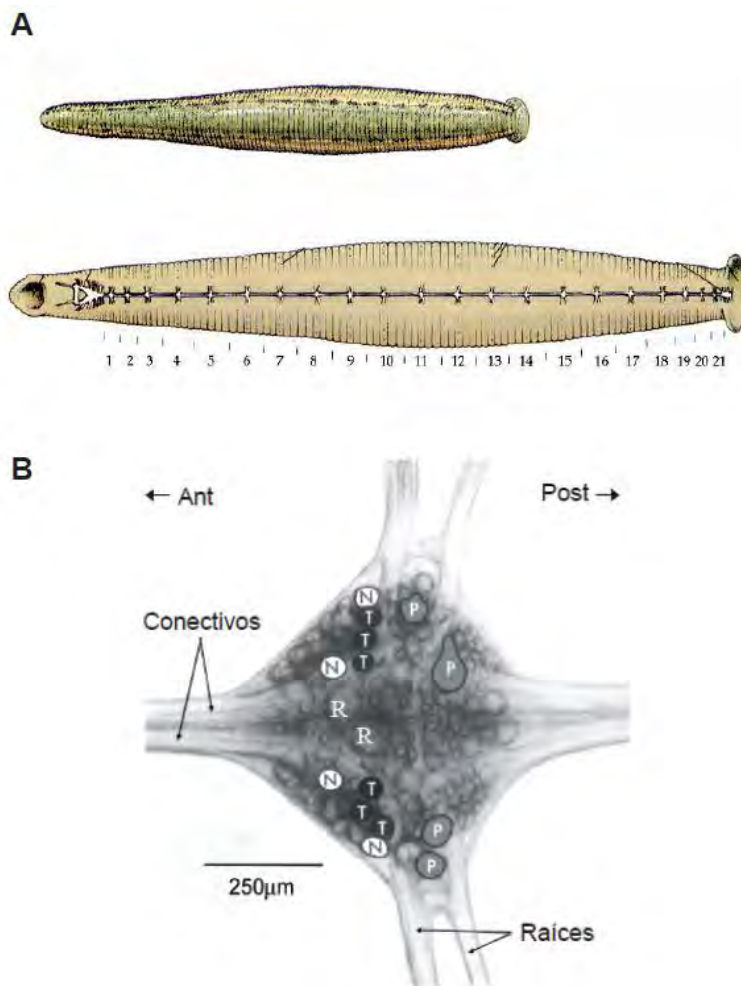


Figura 1.- Sistema nervioso de la sanguijuela *Hirudo verbana*. A) Esquema del sistema nervioso compuesto por una cadena con 21 ganglios similares, y dos masas nerviosas formadas por la fusión de varios ganglios, una anterior y otra posterior. B) Micrografía de un ganglio nervioso con la parte anterior hacia la izquierda (Ant). Las neuronas de Retzius (R) son las neuronas más grandes de cada ganglio (tomado de Nicholls y Baylor, 1968). También se muestran algunas otras neuronas mecanosensoriales (N, T y P).

Las neuronas de Retzius son las que tienen los somas más grandes del ganglio, con diámetros que van de 60 a 80 μm , localizados en el paquete central. Son las mayores productoras de serotonina en cada ganglio (Coggeshall, 1972) y pueden ser estudiadas en el ganglio o en cultivo, ya que a pesar de ser adultas, pueden ser aisladas individualmente y mantenidas en cultivo por semanas, donde continúan sintetizando y liberando serotonina. Si se ponen en contacto con un blanco adecuado pueden regenerar sinapsis. En estas células se han estudiado los mecanismos finos de la exocitosis somática y sináptica de la 5-HT (para revisión ver (De-Miguel and Trueta, 2005a). La liberación sináptica es dependiente de Ca^{2+} , del potencial de membrana presináptico y presenta fenómenos de plasticidad sináptica como son facilitación y depresión (Del Castillo and Katz, 1953, 1954; Kamiya and Zucker, 1994; Katz and Miledi, 1968; Mallart and Martin, 1968; Miledi and Parker, 1981; Stewart et al., 1989).

Aislamiento y cultivo neuronal.

La cadena de ganglios que forma el sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo verbana* se aisló bajo un microscopio estereoscópico, conservando las raíces de los ganglios segmentales unidas a tejido conectivo para facilitar su sujeción posterior. Durante la disección se mantuvo al animal bañado en una solución fisiológica que contenía (en mM): NaCl 120; KCl 4; CaCl_2 2; tris-maleato 10. El pH se ajustó a 7.4 con HCl o NaOH. Las neuronas se aislaron siguiendo el procedimiento de (Dietzel et al., 1986), descrito a continuación.

Los ganglios nerviosos se mantuvieron en medio de cultivo L-15 (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) complementado con 2% de suero bovino fetal (Gibco) inactivado por calor, 6 mg/ml de glucosa y 0.1 mg/ml de gentamicina. Las cápsulas que envuelven a los ganglios se abrieron por la parte ventral y se trataron los ganglios con enzimas proteolíticas (colagenasa-dispasa, 2mg/ml; Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) durante 45 a 60 minutos, después de lo cual las neuronas de Retzius se identificaron visualmente por su localización en el ganglio y su tamaño característico: las dos neuronas de Retzius son las mayores en cada ganglio y se encuentran en la parte central (Figura 2, marcadas con una R).

Las neuronas de Retzius se aislaron una por una mediante la aplicación de succión a través de una micropipeta de vidrio, con lo que se obtuvo el soma unido a una parte del axón primario, al que nos referimos como “muñón axonal” (Figura 3,

marcado con una flecha roja). Las neuronas se enjuagaron varias veces con el medio L-15, dentro de una campana de flujo laminar para eliminar los detritos y microorganismos adheridos y mantenerlas en condiciones de esterilidad, y se sembraron en platos de cultivo (Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA; modificados para ponerles fondo de vidrio), utilizando concanavalina-A (2mg/ml) como substrato (Sigma, St. Louis, MO, USA) en medio L-15 suplementado. Se mantuvieron a 18-20°C y se registraron entre 1 y 7 días después de haberlas sembrado.

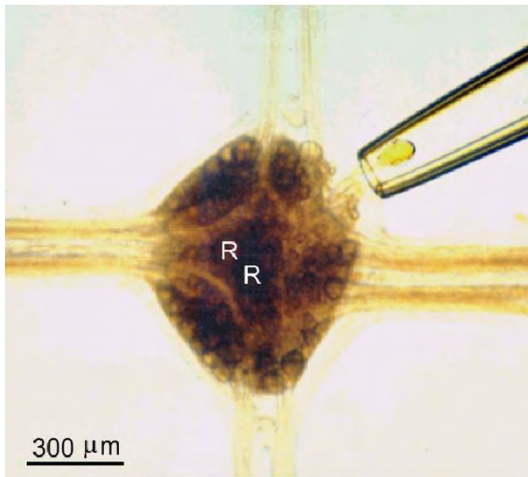


Figura 2.- Aislamiento de neuronas identificadas de un ganglio del sistema nervioso de la sanguijuela. La pipeta de vidrio está aislando una célula P. Las neuronas de Retzius (R) se encuentran en la parte central del ganglio. Tomado de Dietzel et al., 1986

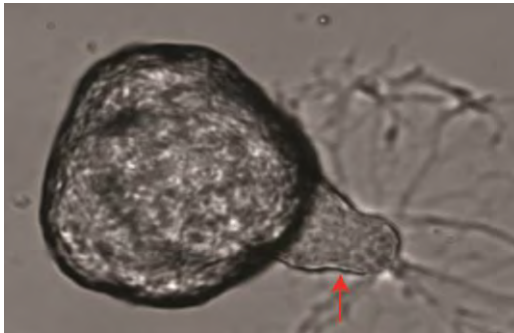


Figura 3.- Neurona de Retzius sembrada en un plato de cultivo tratado con concanavalina A. Imagen con luz transmitida de una neurona Retzius en cultivo mostrando el soma y el muñón remanente del axón primario (flecha roja).

Registro intracelular.

Las neuronas de Retzius fueron estimuladas con microelectrodos intracelulares fabricados a partir de tubos capilares de borosilicato de pared delgada, con un diámetro externo de 1.0 mm, un diámetro interno de 0.75 mm, y con un filamento interno (Federick Haer y Co), utilizando un estirador de pipetas Sutter P-97. Se usaron microelectrodos con resistencias de 18-25 MΩ llenos de acetato de potasio (KAc) 2M.

Se utilizó un amplificador para registro intracelular Axoclamp 2A (Axon Instruments, Union City, CA, USA) en modo de balance de puente ó fijación de corriente para registrar el potencial de membrana y estimular la generación de potenciales de acción. Las neuronas se estimularon inyectando trenes de 10 pulsos de corriente de la amplitud necesaria para producir un potencial de acción y de 10 ms de duración a 1 ó 20 Hz, utilizando un estimulador Grass S88 conectado a una unidad de aislamiento SIU05 (Grass Instruments, W. Warwick, RI, USA). El número de pulsos se mantendrá constante y se variará el intervalo entre ellos para cambiar la frecuencia.

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

Determinaciones de la exocitosis.

Para estudiar la cinética de exocitosis en el muñón axonal de las neuronas de Retzius, se midieron los incrementos en la fluorescencia acumulativa de los colorantes FM1-43 ó FM4-64 (Molecular Probes). Estos colorantes lipofílicos, 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 ó FM4-64 corresponden entonces a sitios de secreción. El colorante FM1-43 se utilizó en experimentos donde se midió únicamente la exocitosis, mientras que el FM4-64 se usó en combinación con el colorante sensible a Ca^{2+} Fluo-4, para el registro simultáneo de exocitosis y señales de Ca^{2+} . Los colorantes FM1-43 o FM4-64 (2 μM) fueron añadidos al baño. 15 minutos después de agregar el colorante se introdujo en la célula un microelectrodo intracelular pasando corriente DC hiperpolarizante para evitar el disparo espontáneo y posteriormente comenzar los registros.

Microscopía electrónica.

Los ganglios fueron lavados con una solución amortiguadora de cacodilato 0.08 M (Sigma) y se fijaron por 10 minutos con glutaraldehído al 0.6% (Sigma) y paraformaldehído al 0.4% en solución de cacodilato pH 7.4, según el procedimiento descrito por Kuffler *et al* (1987). Se realizó una post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% (Fluka) en solución de cacodilato. Los ganglios fueron deshidratados serialmente e infiltrados con Epon-etanol (1:1) durante toda la noche. Después de varias sustituciones de Epon, éste se polimerizó a 60° por 24 horas. Este procedimiento fue llevado a cabo por el Dr. Francisco Fernández de Miguel. Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos que se contrastaron con acetato de uranilo por 10 minutos y con citrato de plomo por 2.5 minutos. Los cortes fueron realizados en la unidad de microscopía del Instituto de Fisiología Celular. Los cortes se observaron en un microscopio electrónico Jeol 1010 (Jeol USA Inc.).

Amperometría.

Para obtener mejor resolución espacial y temporal de la secreción de serotonina, se realizaron registros amperométricos con microelectrodos de fibra de carbono de 10 μm de diámetro, colocados tocando el muñón axonal. Las corrientes de oxidación se registraron con un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments). El potencial de la fibra de carbono se mantuvo a un valor fijo de voltaje de +650 mV (Bruns and Jahn, 1995; Bruns et al., 2000), adquiriendo a una frecuencia de 100 kHz. Las neuronas fueron estimuladas con un microelectrodo intracelular para producir un tren de 10 pulsos a 20 Hz. Las espigas amperométricas registradas fueron capturadas en formato binario. Para el análisis de las espigas se utilizó el macro Quanta Analysis 8.2 (desarrollado en el laboratorio del Dr. David Sulzer en Columbia) para el programa Igor Pro.

Mediciones de calcio intracelular.

Los cambios relativos de la concentración de Ca^{2+} intracelular en el muñón axonal de las neuronas de Retzius se midieron utilizando el colorante fluorescente Fluo-4. El colorante en forma de sal de pentapotasio fue disuelto en agua a una

concentración final de 5 mM y se inyectó a las neuronas por iontoforesis a través de un microelectrodo intracelular. La punta de los microelectrodos se llenó por capilaridad con la solución del colorante y posteriormente el resto del microelectrodo fue rellenado con KCl A 0.1 M.

Una vez que el microelectrodo se introdujo en la célula, se inyectó el colorante aplicando una corriente directa de -4 nA durante 6 minutos. Los experimentos fueron realizados 10-15 minutos después de la inyección del colorante. El colorante fluorescente Fluo-4 sólo permite hacer medidas cualitativas de las concentraciones de calcio.

Imágenes de fluorescencia.

Las células fueron observadas enfocando el muñón axonal en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 200 equipado con un objetivo de 100X, (1,4 de apertura numérica e inmersión en aceite) acoplado a un monocromador (Till Photonics). La fluorescencia de FM1-43 y de Fluo-4 fue registrada en experimentos independientes ante una excitación de 488 nm y una emisión de 535 nm. Se adquirieron secuencias de imágenes de 640x480 pixeles usando una cámara CCD (IMAGO, TillVision) y se almacenaron en una PC con el software TILLvision.

Para estudiar los cambios transitorios rápidos de Ca^{2+} en respuesta a los trenes de estimulación las imágenes fueron adquiridas cada 100 ms durante 60 s. Para estudiar los cambios lentos en la fluorescencia del FM1-43, las imágenes fueron adquiridas cada 2 s por 6 minutos. Se adquirieron imágenes de la fluorescencia basal durante 10 s antes de estimular las neuronas con un tren de diez pulsos intracelulares a 1 ó 20 Hz.

Para los registros simultáneos de exocitosis y de señales de Ca^{2+} , se tomaron imágenes confocales simultáneas de fluorescencia de FM4-64 y Fluo-4, enfocando la célula completa en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000. Se utilizó un láser de una longitud de onda de 560 nm para excitar al FM4-64 y uno de una longitud de onda de 473 nm para excitar al Fluo-4. Las imágenes se adquirieron con un objetivo de 60X (1,1 de apertura numérica e inmersión en agua) utilizando un detector de emisión espectral de 600-700 nm para el FM4-64 y otro de 503-543 nm para Fluo-4. Las secuencias de imágenes se adquirieron cada 2 s durante 20 minutos y fueron guardadas digitalmente usando el software Fluoview 3.1 (Olympus).

Análisis de las imágenes.

Los registros ópticos de las señales de calcio fueron analizados usando el software ImageJ (National Institutes of Health). Las secuencias de imágenes que se adquirieron por varios minutos fueron alineadas con el plug-in StackReg de Image J. La intensidad media de fluorescencia de regiones de interés (ROIs) seleccionadas manualmente fue medida en algunos casos en función del tiempo y en otros en función de la distancia desde la punta del muñón axonal hacia el soma.

La fluorescencia basal F_0 fue calculada promediando las imágenes adquiridas antes de la estimulación. Los cambios en la fluorescencia fueron evaluados como $dF/F = ((F(t) - F_0) / F_0)$ para reducir la variabilidad en la fluorescencia causada por diferencias en el volumen y en la concentración intracelular del colorante (Neher and Augustine, 1992). Por simplicidad en el texto y las figuras esta normalización es referida como dF/F .

Las gráficas de superficie fueron hechas usando una escala de colores RGB de 8 bits calibrada en el intervalo dinámico de la adquisición. Las gráficas y los ajustes de las curvas fueron realizadas usando el software Igor Pro 6.2 (Wavemetrics). Los datos se presentan como media \pm ESM. Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando una prueba de t de Student de dos colas.

Mediciones de la remoción de calcio.

Los mecanismos que remueven el calcio del citoplasma se activan en diferente medida según la concentración de calcio que hay en el citoplasma. Para conocer la relación entre la concentración de calcio citoplasmático y la cantidad de calcio que se remueve, se calculó la derivada de la fase de caída del transitorio rápido de calcio y su inverso se graficó como función de la concentración de calcio durante la caída. A esta relación se le ajustó una función, que para la estimulación a 1 Hz fue una recta de la forma $y = mx + b$, y para la estimulación a 20 Hz fue una doble potencia de la forma: $y = A + Bx^C + Dx^E$.

Esta función indica cómo depende la cantidad de calcio que es removida del citoplasma de la concentración de calcio citoplasmático. Una vez conociendo esta función, se calculó la cantidad de calcio que fue removida del citoplasma en cada momento durante y después de la estimulación eléctrica. Para ello, esta función se aplicó a la señal original, tomando ésta última como abscisa y la función como ordenada. Posteriormente, a la derivada de la señal completa se le sumó esta

cantidad que es removida, para obtener la derivada de la cantidad de calcio total que entró al citoplasma en cada momento (revisado de Guerrero A, et al., 1994).

La integral de esta suma se muestra en las figuras 8, 10, 14 y 15 e indica la integral acumulada de la cantidad de calcio que entra al citoplasma (ya sea a través de la membrana o de los depósitos intracelulares) durante la estimulación.

Tratamientos farmacológicos.

Para evitar la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} del retículo endoplásmico se bloquearon los receptores de rianodina con dantroleno ($10 \mu\text{M}$; Sigma) y después de 5 minutos se observó la respuesta ante un tren de estimulación igual al primero (10 impulsos a una frecuencia de 1 Hz ó 20 Hz). Por otro lado se incubaron neuronas con rianodina ($10 \mu\text{M}$; Invitrogen) y tapsigargina ($10 \mu\text{M}$; Invitrogen) por 30 minutos para vaciar los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Debido a que el sitio de unión a la rianodina se encuentra en la parte interior de los receptores, para que la rianodina se una a éstos es necesario que los canales se encuentren abiertos (Chu et al., 1990; Meissner, 1986; Pessah et al., 1986). Por ello, en estos experimentos fue necesario aplicar un primer tren de estimulación eléctrica para producir la apertura de los receptores de rianodina y tener un efecto adecuado de los fármacos, 5 minutos después de observar la respuesta a esta primera estimulación se aplicó un segundo tren de estimulación idéntico y se compararon las respuestas al primero y segundo tren de estimulación.

Para bloquear los canales de calcio sensibles a voltaje tipo L utilizamos nimodipina ($10\mu\text{M}$; Sigma-Aldrich). Para bloquear de manera no selectiva los canales de calcio sensibles a voltaje se agregó cadmio ($200 \mu\text{M}$; Sigma) al medio extracelular.

Resultados

Cinética de la exocitosis axonal.

La cinética de exocitosis en el muñón axonal de neuronas aisladas fue analizada, a partir de la incorporación del colorante fluorescente FM1-43. Este colorante lipofílico, añadido en el fluido extracelular, incrementa su fluorescencia cuando se une 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 haber mayor superficie de membrana expuesta al colorante hay un incremento en la intensidad de la fluorescencia. Los sitios en donde aumentó la intensidad de la fluorescencia de FM1-43 corresponden entonces a sitios de secreción. Por consiguiente, la cinética de exocitosis se estudió a partir de la formación de puntos fluorescentes de FM1-43 en diferentes áreas de la superficie del muñón axonal en imágenes enfocadas en el plano ecuatorial.

El incremento en la fluorescencia de FM1-43 en respuesta a la estimulación con un tren de 10 impulsos a 1 Hz, que duró 10 s, tuvo una cinética lenta que inició 15.76 ± 6.52 s después del comienzo del tren y duró 71.1 ± 7.42 s (6 puntos fluorescentes en diferentes áreas del muñón axonal para cada célula; n=6 células). Por otro lado, la estimulación con un tren de 10 impulsos a 20 Hz, que duró 0.5 s, produjo un incremento de fluorescencia con una cinética similar a la observada ante un tren a 1 Hz pero de mayor amplitud, seguido de un segundo incremento retardado que incrementó la duración total de la secreción a 281.60 ± 11.19 s (6 puntos fluorescentes en diferentes áreas del muñón axonal; n=6 células) (Figura 4A).

Dado que los incrementos en la fluorescencia fueron lentos y de larga duración, comparados con aquellos esperados para procesos de liberación sináptica, suponemos que estas dos pozas vesiculares liberan en sitios extrasinápticos. Dado que la microscopía electrónica muestra la presencia predominante de vesículas electrodensas en sitios extrasinápticos (Figura 4D), es posible suponer que se trata de vesículas electrodensas.

Al analizar la distancia más cercana de las vesículas a la membrana plasmática a partir de micrografías electrónicas del axón de las neuronas de Retzius en el ganglio (Figura 4D), obtuvimos una distribución de frecuencias cuyo mejor ajuste fue a tres poblaciones Gaussianas (Figura 4E): una con una distancia corta a la membrana, con

promedio de 70 ± 40 nm, otra a una distancia intermedia con promedio de 100 ± 270 nm, y otra más alejada, a una distancia promedio de 490 ± 550 nm.

Algunos axones contienen vesículas electrodensas rodeando a vesículas claras adosadas a la membrana en zonas activas sinápticas (za; Figura 4C). Esta distribución diferencial de vesículas electrodensas es consistente con lo observado en las cinéticas de exocitosis obtenidas utilizando el colorante FM1-43, las cuales también sugieren la fusión de tres diferentes grupos de vesículas con la membrana plasmática en respuesta a diferentes condiciones de estimulación. En respuesta a 1 Hz se estarían liberando únicamente las vesículas que se encuentran muy cerca de la membrana produciendo únicamente un incremento en la cinética de la fluorescencia, mientras que a 20 Hz se estarían liberando inicialmente vesículas de esta poza y además algunas intermedias produciendo un primer incremento similar en escala temporal al que observamos en respuesta a 1 Hz pero de mayor amplitud. Adicionalmente a 20 Hz se estaría produciendo la movilización y fusión de vesículas de la poza más alejada produciendo el segundo incremento, que se observa retrasado en el tiempo.

Registros amperométricos realizados colocando una fibra de carbono (de 10 μm de diámetro) en contacto con la parte lateral del muñón axonal y estimulando a la neurona con un tren de 10 impulsos a 20 Hz, mostraron la presencia de espigas (Figura 4B), cuya amplitud (26.33 ± 16.26 pA DS) y carga (35.17 ± 29.17 fC DS) corresponden a los valores reportados para las vesículas electrodensas (Bruns et al., 2000; Cercós MG *et al.*, en preparación). El tiempo de aparición de las espigas después de la estimulación es de aproximadamente 15 s, lo cual coincide con el tiempo en el que comienzan los incrementos en la cinética de exocitosis medidos utilizando FM1-43 (15.76 ± 6.52 s). Además, la carga acumulada de los registros amperométricos (Figura 4C) muestra una cinética similar a la de la fluorescencia de FM1-43, confirmando que dicha fluorescencia refleja el proceso de exocitosis de estas vesículas.

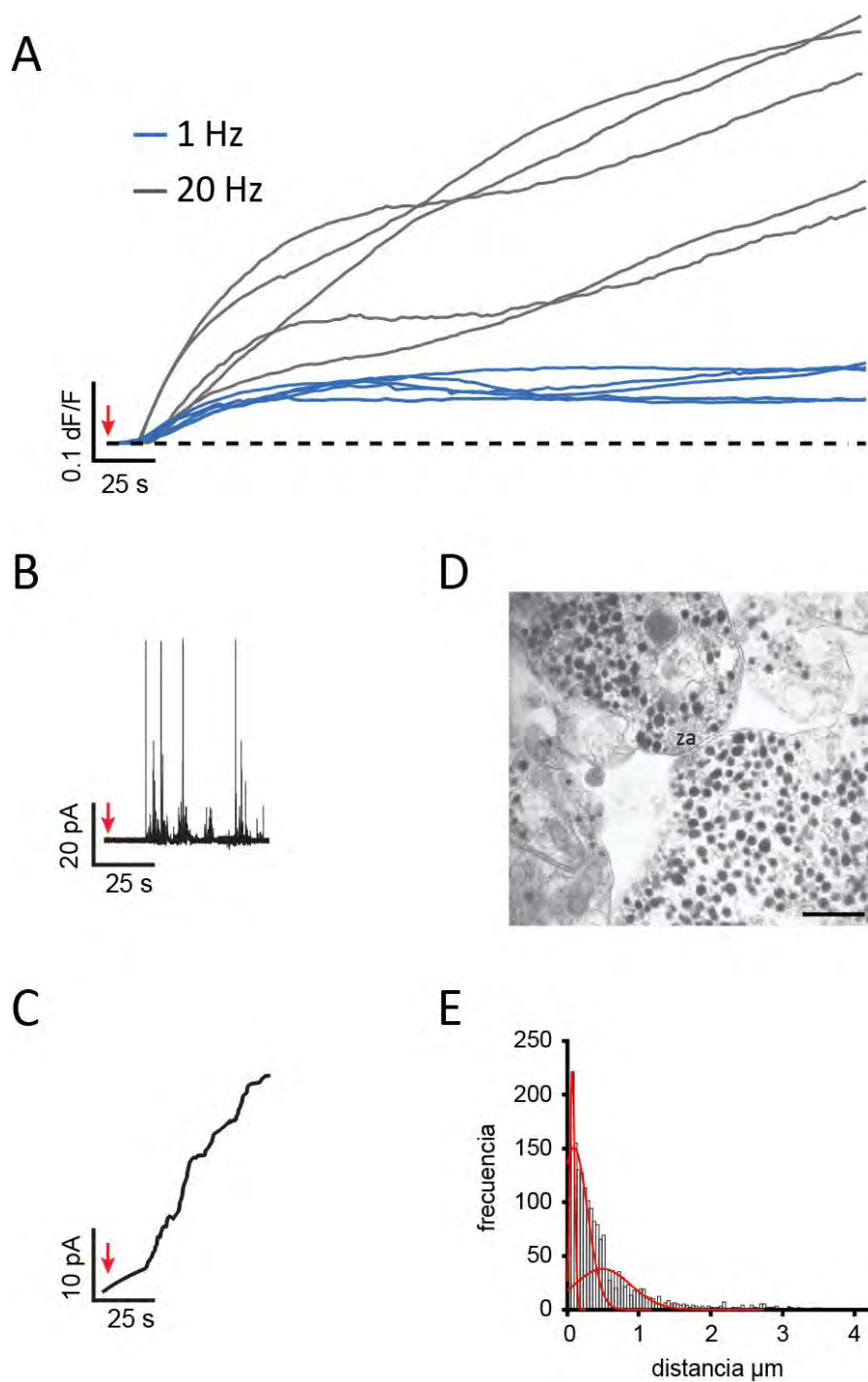


Figura 4.- La exocitosis extrasináptica axonal depende de la frecuencia de estimulación. A) Cinéticas representativas de la fluorescencia de FM1-43 en respuesta a la estimulación con un tren de 10 impulsos a 1 Hz (azul) ó 20 Hz (gris). B) Registro amperométrico representativo donde se muestran espigas en respuesta a un tren de 10 Impulsos a 20 Hz (La flecha roja indica el inicio de la estimulación). C) Carga acumulada obtenida del registro amperométrico mostrado en B. La carga acumulada muestra una cinética y un retraso en el incremento de la señal similar a los observados en las cinéticas de la

fluorescencia de FM1-43 mostradas en A). D) Micrografía del axón de una neurona de Retzius en el ganglio, donde se observan vesículas electrodensas localizadas a diferentes distancia de la membrana plasmática. Algunas vesículas electrodensas se encuentran rodeando a vesículas claras en zonas activas (za). Barra escala 500 nm. E) Histograma de la distribución de frecuencias de la distancia a la que se encuentran las vesículas electrodensas con respecto a la membrana plasmática. El mejor ajuste a esta distribución es a tres poblaciones Gaussianas (mostradas en rojo).

Estos resultados muestran que la exocitosis extrasináptica que se produce en el axón primario de las neuronas serotoninérgicas de Retzius ocurre por la fusión de diferentes grupos de vesículas electrodensas. Cabe destacar que esta exocitosis extrasináptica es activada por la actividad eléctrica a una frecuencia baja como 1 Hz, en contraste con la exocitosis extrasináptica en el soma de muchas neuronas, que en general necesita trenes de potenciales de acción a altas frecuencias o despolarizaciones largas para activarse (para revisión ver Trueta and De-Miguel, 2012). La exocitosis extrasináptica en respuesta a baja frecuencia de estimulación en el axón primario es posible debido a una poza de vesículas localizada más cerca de la membrana plasmática.

Dado que la exocitosis requiere del incremento de calcio en el citoplasma, estudiamos la dinámica de la concentración del calcio intracelular en el axón en respuesta a la estimulación eléctrica a cada frecuencia y su contribución en la exocitosis.

Transitorios de Ca^{2+} y la exocitosis.

La exocitosis es un proceso dependiente de calcio, y es necesario que se incremente la concentración de calcio en el citoplasma para que las vesículas se movilicen y fusionen con la membrana plasmática para liberar su contenido. Para explorar cómo el Ca^{2+} contribuye a la exocitosis axonal, estudiamos las cinéticas de la exocitosis y la $[Ca^{2+}]_i$ usando registros ópticos simultáneos de los colorantes FM4-64 (una análogo del FM1-43 cuya banda de emisión se encuentra en rojo) y Fluo-4 con microscopía confocal (Figura 5). Las imágenes se adquirieron cada 2 segundos.

En el axón de las neuronas de Retzius, un tren de estimulación a 1 Hz ó 20 Hz produjo una secuencia de dos incrementos transitorios en la $[Ca^{2+}]_i$, cada uno con diferente cinética y efecto sobre la exocitosis. El primer transitorio consistió en una espiga rápida asociada con la estimulación eléctrica (marcado como 1 en la Figura 5). El segundo fue más lento y de mayor duración (marcado como 2 en la Figura 5). Este

segundo transitorio inició durante el intervalo dinámico de la exocitosis y decayó cuando la exocitosis estaba por terminar.

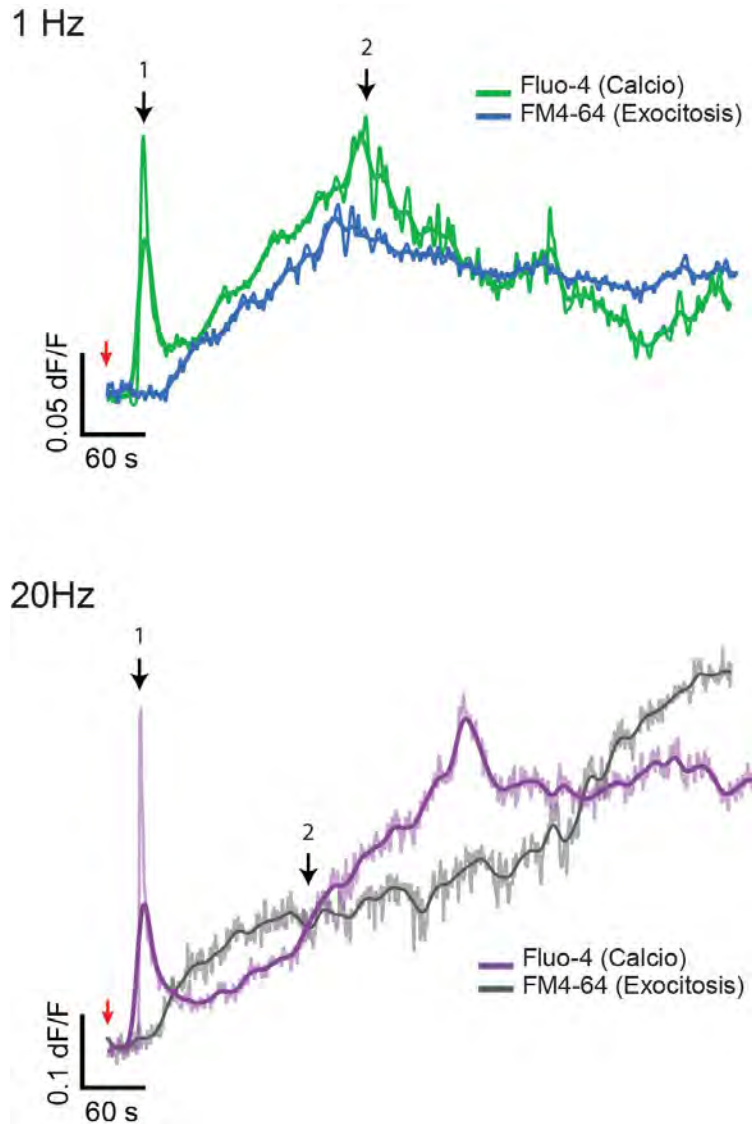


Figura 5.- Dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la exocitosis en respuesta a diferentes frecuencias de estimulación. Cinéticas representativas de la fluorescencia de FM4-64 (Exocitosis) y de Fluo-4 (Calcio) en respuesta a la estimulación a 1 Hz (trazos superiores) ó 20 Hz (trazos inferiores). La señal de Ca^{2+} comenzó con un transitorio rápido (marcado con el número 1) que ocurrió en respuesta a la estimulación eléctrica (la flecha roja indica el momento en el que se aplicó el tren de estimulación). El segundo componente de la señal de Ca^{2+} fue un incremento lento y grande (marcado con el número 2) que comenzó después del inicio del incremento de fluorescencia de FM4-64 (marcado en azul para 1 Hz y en gris para 20 Hz) y se desarrolló durante toda la duración de la exocitosis.

Resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo mostraron que en el soma de las neuronas de Retzius ocurren dos transitorios de calcio similares en respuesta a la estimulación a 20 Hz. Estos resultados sugieren también que el transitorio rápido de calcio (marcado como 1 en la Figura 5), que ocurre en respuesta a la estimulación eléctrica, es necesario para que las vesículas que se encuentran alejadas de la membrana se movilicen y puedan liberar su contenido. Es por ello que posteriormente analizaremos con profundidad este transitorio, analizando las fuentes que lo componen y su dependencia de la frecuencia de estimulación.

Por otro lado, nuestro trabajo previo ha mostrado que en el soma de estas neuronas el transitorio lento es producido por un mecanismo de retroalimentación positiva activado por la serotonina liberada mediante su unión a autorreceptores acoplados a la fosfolipasa C, que activan la producción de IP3. Esto produce la liberación de calcio de depósitos intracelulares submembranales, lo cual permite la fusión de las vesículas que van llegando a la membrana (Leon-Pinzon et al., 2014). Este mecanismo de retroalimentación positiva es necesario para sostener la exocitosis por periodos prolongados como los que se muestran aquí y asegura que todas las vesículas que se movilizaron hacia la membrana se fusionen con ésta y liberen su contenido.

*Características del transitorio **lento** de Ca^{2+} a distintas frecuencias de estimulación y su contribución en la exocitosis.*

A diferencia del soma, donde la estimulación a 1 Hz produjo un incremento transitorio rápido de calcio pero no el transitorio de calcio lento ni exocitosis (Leon-Pinzon et al., 2014), en el muñón axonal la estimulación a esta frecuencia sí activó un transitorio de calcio lento asociado a la respuesta secretora, además del transitorio rápido asociado al tren de estimulación. La estimulación a 20 Hz, por otro lado, produjo un transitorio rápido y uno lento de calcio y dos fases de subida en la fluorescencia de FM4-64 que reflejan dos fases de secreción, tanto en el soma (Leon-Pinzon et al., 2014) como en el muñón axonal (Figura 5 trazo gris).

Las vesículas más alejadas de la membrana presentes en el axón sí requieren de la estimulación a frecuencias altas para su movilización y posterior fusión. La acumulación de calcio producida por la estimulación repetitiva a altas frecuencias activa el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio, presumiblemente a partir del retículo endoplásmico presente en los axones (para revisión ver González y

Couve, 2014), permitiendo que el transitorio rápido de calcio se amplifique y se propague, lo que permite la movilización de la poza de vesículas que se encuentra alejada de la membrana plasmática.

Dado que la duración de la exocitosis en el axón (tanto en respuesta a la estimulación tanto a 1 Hz como a 20 Hz) son mucho mayores que el tiempo que dura el transitorio rápido de calcio (36.69 ± 1.76 s), analizamos la posibilidad de que, al igual que en el soma, la exocitosis por largos tiempos sea sostenida por el transitorio lento de calcio. Para ello analizamos las cinéticas de la exocitosis y de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a diferentes frecuencias de estimulación (1 Hz y 20 Hz) en el muñón axonal en neuronas incubadas con una combinación de rianodina ($10\mu\text{M}$) y tapsigargina ($1.6\mu\text{M}$), que vacía los depósitos intracelulares de calcio.

En neuronas incubadas con esta combinación de fármacos la estimulación a 1 Hz, produjo un incremento en la fluorescencia de FM1-43 con una fase dinámica de solamente 30.25 ± 6.94 s (Figura 6A, trazo rojo), mientras que en condiciones control la duración de la exocitosis fue de 71.11 ± 7.42 s (Figura 6A trazo azul). Las neuronas estimuladas a 20 Hz e incubadas con los mismos fármacos tuvieron una cinética de exocitosis que duró sólo 29.53 ± 6.36 s (Figura 6B, trazo rojo), mientras que en condiciones control la duración de la exocitosis fue de 281.60 ± 11.19 s (Figura 6B, trazo gris). Como se puede apreciar, cuando se vaciaron los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , la duración de la secreción fue la misma, independientemente de la frecuencia de estimulación. La secreción en estas condiciones duró únicamente el tiempo que duró el transitorio rápido de calcio (36.69 ± 1.76 s), que fue el único tiempo en que el calcio en el citoplasma permaneció elevado (Figura 6C).

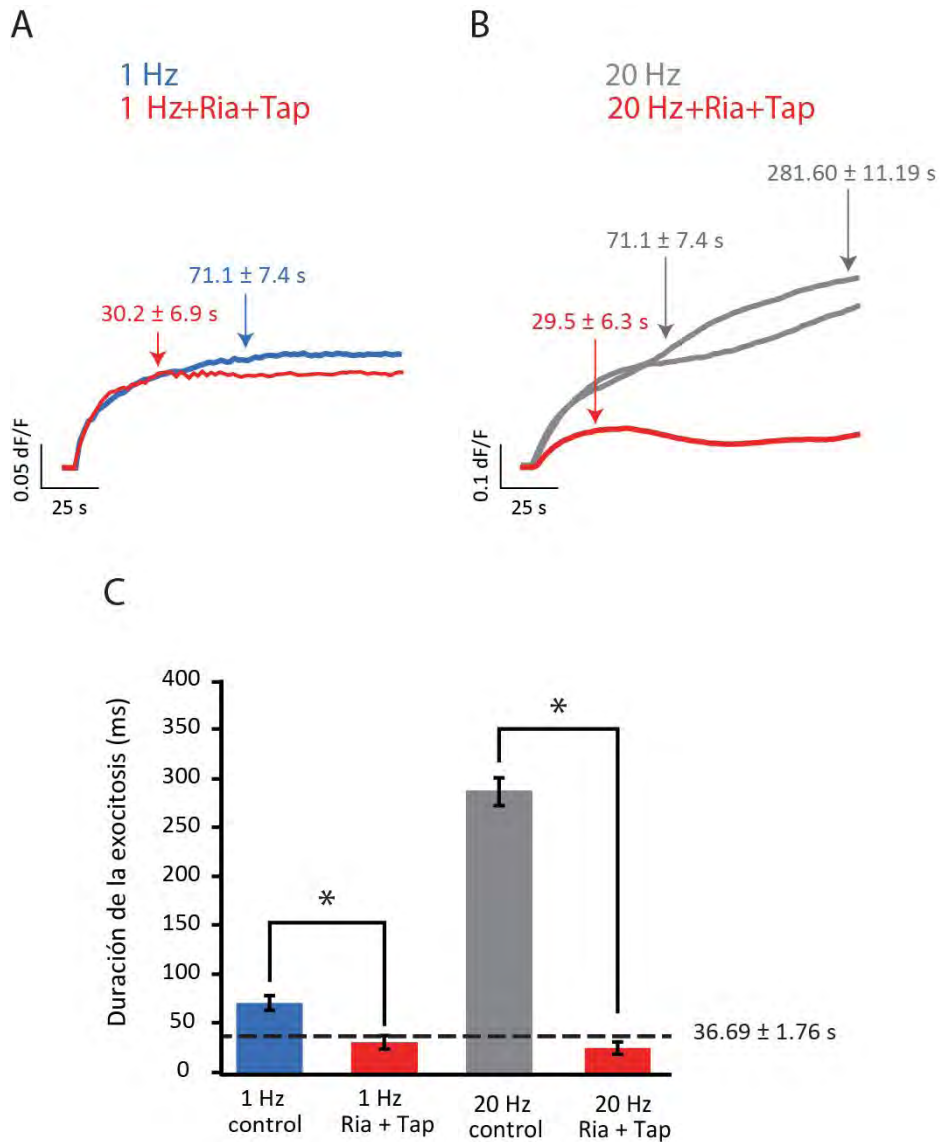


Figura 6.- El vaciamiento de los depósitos intracelulares acorta la secreción a ambas frecuencias de estimulación (1 y 20 Hz). Comparación de la duración de la fluorescencia de FM1-43 en neuronas incubadas con rianodina + tapsigargina, estimuladas a 1 Hz (inciso A, trazo color rojo) ó a 20 Hz (inciso B, trazo color rojo) y neuronas en ausencia de fármacos estimuladas a 1 Hz (inciso A, trazo color azul) ó a 20 Hz (inciso B, trazo color gris). Las flechas indican el momento en que se alcanza una meseta, marcando el final de cada fase de exocitosis en cada cinética. C) Promedio de la duración de la exocitosis en respuesta a la estimulación a cada frecuencia (1 Hz y 20 Hz) en condiciones control (azul, 1 Hz; gris, 20 Hz) y en presencia de rianodina + tapsigargina (rojo). Cuando se vaciaron los depósitos intracelulares de calcio la exocitosis duró lo mismo independientemente de la frecuencia de estimulación. Los asteriscos muestran diferencias significativas (n=6 células para cada grupo).

Además del acortamiento de la duración de la exocitosis, cabe hacer énfasis que en las neuronas estimuladas a 20 Hz incubadas con rianodina + tapsigargina, desapareció la segunda fase de exocitosis al desaparecer el transitorio lento de Ca^{2+}

(Figura 7). La primera fase de exocitosis no desapareció, aunque sí se hizo más corta como se muestra con mayor detalle en la Figura 6. Estos resultados sugieren que el mecanismo de retroalimentación positiva es necesario para sostener la exocitosis por periodos prolongados.

Además en respuesta a la estimulación a 20 Hz, la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares no sólo asegura que todas las vesículas que se movilizaron se fusionen, sino que también permite que durante el transitorio rápido de calcio la señal de calcio se propague hacia el centro del axón, permitiendo la movilización de vesículas que se encuentran alejadas de la membrana plasmática axonal produciendo la segunda fase de exocitosis.

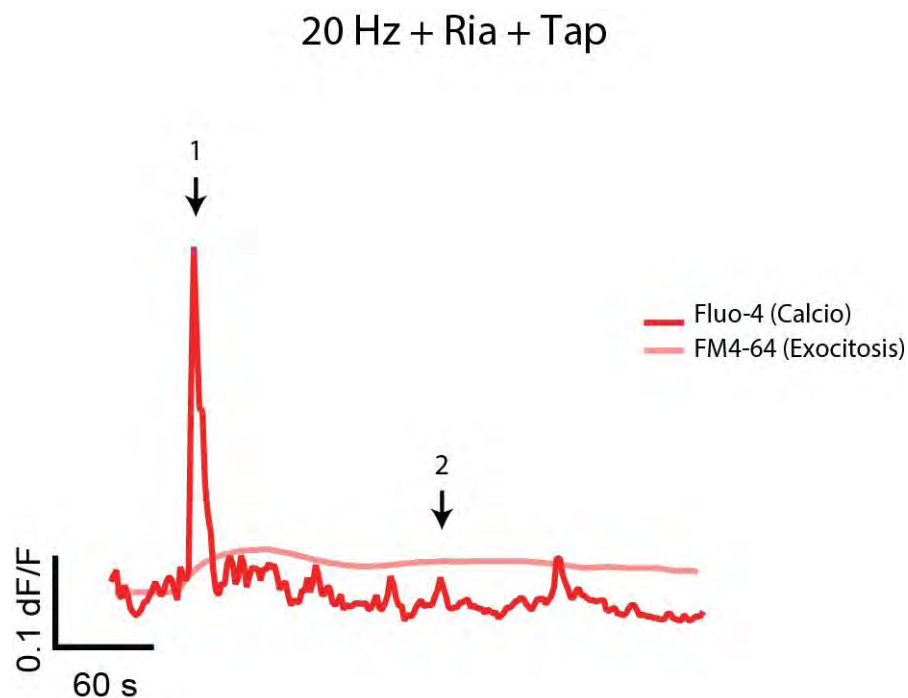


Figura 7.- La segunda fase de exocitosis en neuronas estimuladas a 20 Hz depende del transitorio lento de Ca^{2+} . Cinéticas representativas de la fluorescencia de FM4-64 (Exocitosis) y de Fluo-4 (Calcio) en una neurona incubada con rianodina + tapsigargina y estimulada a 20 Hz. La flecha con el número 1 señala el primer componente de la señal de Ca^{2+} . El segundo componente de esta señal (marcado con el número 2) y el segundo incremento de FM4-64 desaparecen al vaciar los depósitos intracelulares de Ca^{2+} con esta combinación de fármacos.

Recapitulando, el transitorio de calcio rápido que se produce en respuesta a la estimulación a 20 Hz permite la movilización de la poza de vesículas que se encuentra alejada de la membrana plasmática. Posteriormente, el mecanismo de

retroalimentación positiva que activa la serotonina liberada permite que las vesículas que estaban cerca de la membrana plasmática se fusionen con ésta y liberen su contenido, alargando así la primera fase de exocitosis y además permite que la poza de vesículas distante que se movilizó hacia la membrana pueda fusionarse también, produciendo una segunda fase de exocitosis. En respuesta a la estimulación a 1 Hz no ocurre la liberación de calcio inducida por calcio en respuesta al tren de estimulación eléctrica, por lo que se activa únicamente la primera fase de exocitosis, sostenida por la retroalimentación positiva.

En el soma de las neuronas de Retzius mostramos previamente que es el transitorio rápido de Ca^{2+} el que determina el número de vesículas que se movilizan hacia la membrana plasmática, por lo que a su vez de forma indirecta determina el número de vesículas que van a poder liberar su contenido (Leon-Pinzon et al., 2014). Es por ello que fue de nuestro particular interés estudiar con detalle los elementos que componen este transitorio de calcio y su importancia en la liberación extrasináptica en el axón.

Características del transitorio **rápido** de Ca^{2+} a distintas frecuencias de estimulación.

Para poder estudiar en detalle el transitorio rápido de Ca^{2+} asociado con la actividad eléctrica, adquirimos secuencias de imágenes con un intervalo de 100 ms entre ellas, y analizamos los incrementos en la fluorescencia del Fluo-4 tomando como región de interés a todo el muñón axonal (incremento global).

El transitorio rápido de Ca^{2+} producido por la estimulación a 1 Hz ocurrió únicamente en áreas cercanas a la membrana, principalmente en la punta del muñón axonal (Figura 8B panel izquierdo) y consistió en una sucesión de 10 picos (Figura 8C, trazo verde), cada uno acoplado a un potencial de acción en el tren, con un tiempo al pico de 100 ms (cabe aclarar que la resolución está limitada por el intervalo de 100 ms del muestreo de imágenes, esta resolución nos permitió resolver para esta frecuencia los incrementos en respuesta a cada impulso). El incremento máximo de fluorescencia alcanzado por este transitorio ocurrió después del último impulso y fue de $767 \pm 113\%$ sobre la basal, (Figura 8C'). A partir de este punto la señal de Ca^{2+} decayó exponencialmente con una constante de tiempo de 8.3 ± 0.98 s (Figura 8D y D'; n= 6 células).

En contraste, el transitorio rápido de Ca^{2+} producido por un tren a 20 Hz se propagó de manera retrógrada y hacia el centro del axón (Figura 8B panel derecho).

Este transitorio comenzó al inicio de la estimulación y alcanzó su máxima amplitud 600 ms después del inicio del tren (Figura 8C). Su amplitud al pico fue $1716 \pm 188\%$ por encima de la fluorescencia basal, que es el doble de la amplitud obtenida en respuesta a la estimulación a 1 Hz (Figura 8C'; n= 6 células), y su caída se ajustó a dos exponenciales con constantes de tiempo de 3.6 ± 1 s y 9.1 ± 1.22 s (Figura 8D y D'; n= 6 células). La segunda constante de tiempo es similar a la de la caída del transitorio producido por la estimulación a 1 Hz, mientras que la primera es más rápida, lo cual podría indicar que a 1 Hz se activan mecanismos de amortiguamiento pasivo, mientras que a 20 Hz se activa además un mecanismo activo como pueden ser ATPasas que sacan al calcio de la célula o incluso se podría tratar de la mitocondria.

Debido a que las altas concentraciones de calcio son tóxicas para las células, existen como se mencionó anteriormente diversos mecanismos endógenos de amortiguamiento que permiten controlar la $[Ca^{2+}]_i$. La amplitud diferencial del transitorio rápido de Ca^{2+} en función de la frecuencia podría deberse a diferencias en los mecanismos de remoción que se activan dado el curso temporal de cada una de las señales. A 1 Hz ocurre remoción después de cada uno de los incrementos de Ca^{2+} en respuesta a cada impulso, mientras que para 20 Hz ocurre sólo remoción después del único transitorio rápido que se produce. Por tal razón, para calcular el flujo real de calcio hacia el citoplasma en respuesta a la estimulación a cada frecuencia utilizamos un análisis que permite calcular la remoción de Ca^{2+} a partir de la fase de la caída de la señal y restársela a la señal completa de Ca^{2+} , para quedarnos únicamente con el flujo acumulado de calcio hacia el citoplasma (Figura 8E). El flujo acumulado hacia el citoplasma en respuesta a un tren a 20 Hz fue 30% mayor que en respuesta a un tren a 1 Hz (Figura 8E' n=6 células).

El hecho de que exista una diferencia en el flujo acumulado hacia el citoplasma en respuesta a diferentes frecuencias aún quitando la remoción del calcio, sugiere que en respuesta a la estimulación a 20 Hz se activa una fuente de calcio adicional a las que se activan a 1 Hz. Ya que la entrada de calcio por los canales sensibles a voltaje en respuesta a un impulso es siempre la misma, posiblemente a 1 Hz se active principalmente la entrada de calcio transmembranal, y a 20 Hz se active además la liberación de calcio inducida por calcio de los depósitos intracelulares, produciendo un incremento mayor en la $[Ca^{2+}]_i$.

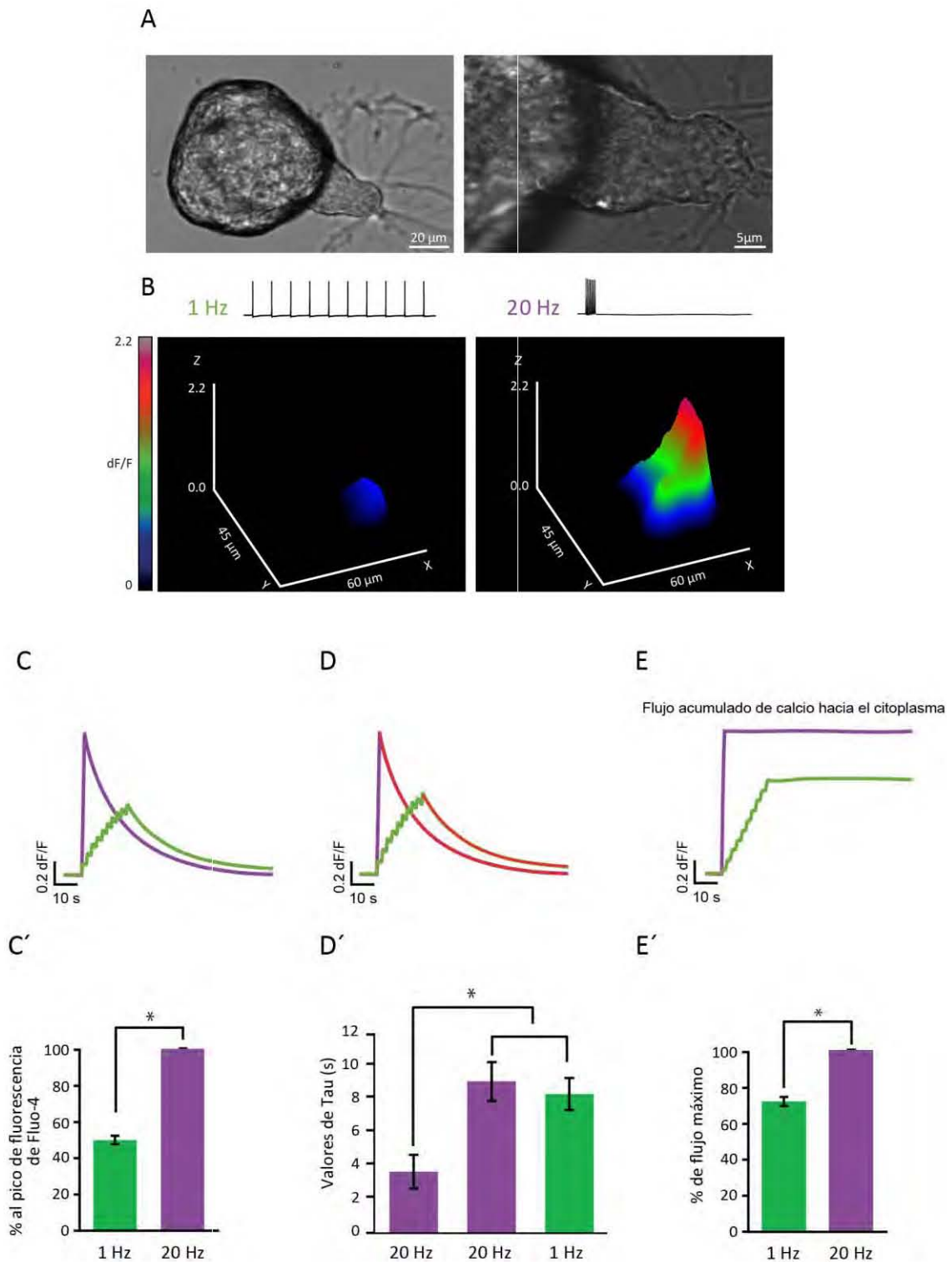


Figura 8.- El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ depende de la frecuencia de estimulación. A) Imágenes de luz transmitida de una neurona de Retzius enfocada con un objetivo 40X (panel izquierdo) ó con un objetivo 100X (panel derecho). Al utilizar el objetivo de 100X las imágenes se centran únicamente en el muñón axonal. B) Gráficas de superficie del aumento de fluorescencia en el muñón axonal de una neurona estimulada con un tren de diez impulsos a 1 Hz (panel izquierdo) ó 20 Hz (panel derecho). Los ejes X y Y corresponden al área de adquisición de las imágenes y el eje Z es el valor de la intensidad de la

fluorescencia (dF/F) en cada pixel. C) Cinéticas de la fluorescencia de Fluo-4 (promedio de toda el área del muñón) en respuesta a la estimulación con un tren de 10 impulsos a 1 Hz (verde) ó 20 Hz (morado). C') Promedio de la amplitud máxima de la fluorescencia de Fluo-4 por encima de la fluorescencia basal para cada frecuencia de estimulación (n=6 células). D) Ajustes exponenciales (marcados en rojo) a las caídas de las cinéticas mostradas en C. D') Constantes de tiempo de caída para las cinéticas de fluorescencia de neuronas estimuladas a 1 Hz y 20 Hz. Las neuronas estimuladas a 20 Hz presentan dos constantes de tiempo de caída, una similar a la que se obtiene a 1 Hz y otra más rápida. E) Cinéticas del flujo acumulado de calcio hacia el citoplasma en respuesta a la estimulación a 1 Hz (verde) ó 20 Hz (morado). La remoción de calcio desde el citoplasma se calculó a partir de la fase de caída y se restó de la señal entera (ver métodos). E') Promedio del flujo máximo de calcio hacia el citoplasma (n=6 células). El flujo de calcio hacia el citoplasma en respuesta a un tren a 20 Hz fue mayor que en respuesta a 1 Hz. Los asteriscos muestran diferencias significativas. Cada célula fue estimulada a 1 y 20 Hz para poder analizar y comparar las respuestas de la misma célula en función de la frecuencia de estimulación.

De forma complementaria a los resultados previos, durante el análisis que elimina la remoción del calcio observamos que al obtener la derivada de la caída en función del tiempo y graficarla en función de la $[Ca^{2+}]_i$, la respuesta a la estimulación a 1 Hz se ajusta a una ecuación lineal (Figura 9, panel izquierdo), mientras que la respuesta a una estimulación a 20 Hz se ajusta mejor a una suma de potencias (Figura 9, panel derecho). Esto es consistente con lo que habíamos mostrado anteriormente con los ajustes a una o dos exponenciales, lo que sugiere nuevamente dos posibles mecanismos de amortiguamiento. Estos resultados podrían también mostrar de forma indirecta que en respuesta a 20 Hz se está activando una fuente alterna de calcio, que no se activa en respuesta a la estimulación a 1 Hz, y esto provoca a su vez que se active más de un mecanismo de amortiguamiento o remoción de calcio.

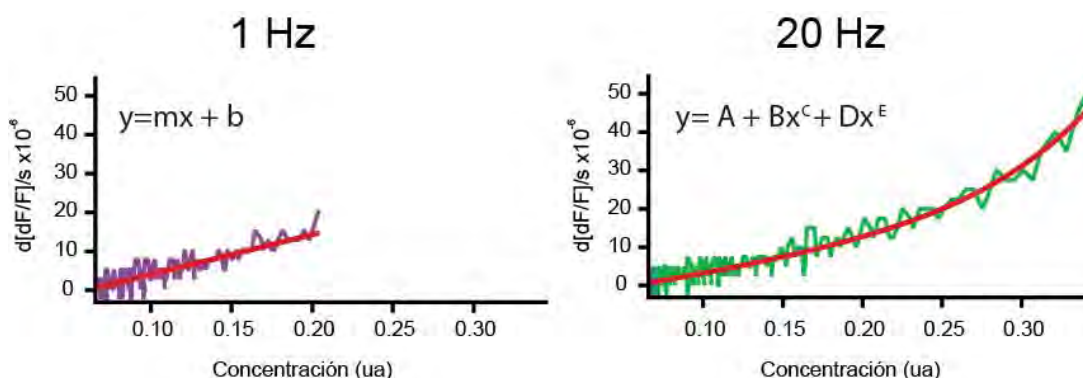


Figura 9.- La velocidad de remoción del Ca^{2+} depende de la $[Ca^{2+}]_i$, que a su vez depende de la frecuencia de estimulación. La derivada de la caída de la fluorescencia de Fluo-4 en función de la

$[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a una estimulación a 1 Hz (panel izquierdo) se ajusta a una función lineal pero en respuesta a una estimulación a 20 Hz se ajusta a una suma de potencias (panel derecho).

Recapitulando, la estimulación con 10 impulsos a 20 Hz produjo un incremento significativamente mayor tanto en la amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ como en el flujo acumulado de calcio hacia el citoplasma, que el mismo número de impulsos a una frecuencia de 1 Hz. El flujo acumulado de calcio hacia el citoplasma guarda una relación altamente no-lineal con el número de impulsos, dependiendo de la frecuencia de estimulación, lo que indica que es probable que a 20 Hz se esté activando una fuente de calcio adicional a las que se activan a 1 Hz. Por ello estudiamos la participación de la liberación de calcio inducida por calcio como una posible fuente alterna que se activa en respuesta a la estimulación a 20 Hz.

Participación de la liberación de calcio inducida por calcio en el transitorio rápido de Ca^{2+} .

El incremento supralineal en la $[Ca^{2+}]_i$ que origina el transitorio rápido a 20 Hz, a diferencia del tren a 1 Hz (Figura 8) sugiere que la suma de la entrada de Ca^{2+} transmembranal ante la estimulación a 20 Hz activa la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares.

Para investigar si la liberación de calcio inducida por calcio en el muñón axonal se activa preferentemente ante la estimulación a altas frecuencias, vaciamos los depósitos intracelulares de calcio incubando a las células con una combinación de rianodina (10 μ M) y tapsigargina (1.6 μ M) ó bloqueamos los receptores de rianodina utilizando dantroleno (10 μ M).

Para realizar los experimentos con rianodina + tapsigargina se incubaron las células con estos dos fármacos durante 30 minutos antes de estimularlas. Como se explicó en la sección de métodos, para estos experimentos fue necesario aplicar un primer tren de estimulación para abrir los receptores de rianodina (porque el sitio de unión a la rianodina se encuentra al interior del receptor), y observar el efecto en respuesta a un segundo tren de estimulación que produjimos 5 minutos después del primero.

Al vaciar los depósitos intracelulares de calcio con una combinación de rianodina y tapsigargina se produjo una disminución de 54.58 ± 4.2 % (Figura 10C,

panel inferior, n=6) en la $[Ca^{2+}]_i$ global en respuesta a la estimulación a 20 Hz, pero no a 1 Hz (Figura 10C, panel superior). Además, la caída del transitorio de calcio producido a 20 Hz en presencia de estos fármacos se ajustó a una sola exponencial, a diferencia de la condición control, en la que la caída tuvo un comportamiento bi-exponencial y de igual forma la derivada de la caída graficada en función de la concentración de calcio se ajustó a una función lineal tal y como ocurre ante una estimulación a 1 Hz aunque las células fueron estimuladas a 20 Hz (los datos no se muestran).

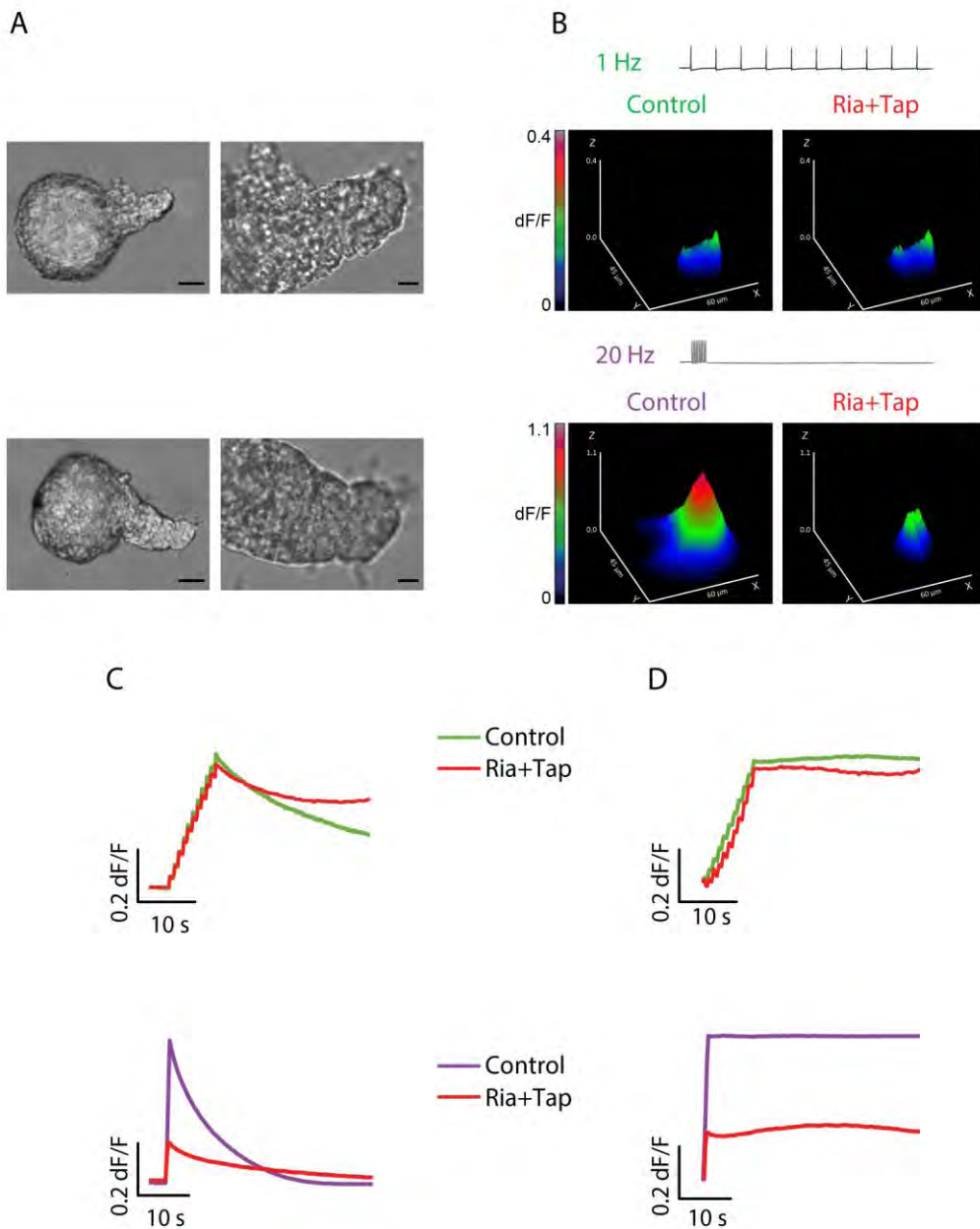


Figura 10.- El bloqueo de la liberación de calcio inducida por calcio de los depósitos intracelulares disminuye la $[Ca^{2+}]_i$ ante la estimulación a altas frecuencias. Efecto de la combinación de rianodina (10 μ M) y tapsigargina (1.6 μ M) sobre el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el muñón axonal ante la estimulación a 1 ó 20 Hz. A) Imágenes de transmisión de una neurona de Retzius enfocada con un objetivo 40X (panel izquierdo, barra escala 20 μ m) ó con un objetivo 100X (panel derecho, barra escala 5 μ m). Al utilizar el objetivo de 100X las imágenes se centran únicamente en el muñón axonal. B) Gráficas de superficie del aumento de la fluorescencia en el muñón axonal de una neurona estimulada a 1 Hz (panel superior) ó 20 Hz (panel inferior) en ausencia (control; panel izquierdo) o presencia (panel derecho) de rianodina + tapsigargina (B). Los ejes X y Y corresponden al área de adquisición de las imágenes y el eje Z es el valor de la intensidad de la fluorescencia (dF/F). C) Cinética de la fluorescencia (promedio de toda el área del muñón) en respuesta a la estimulación en ausencia (1Hz, trazo color verde; 20 Hz, trazo color morado) y en presencia de rianodina + tapsigargina (trazos color rojo). D) Flujo acumulado de calcio hacia el citoplasma en respuesta a la estimulación en ausencia (1 Hz, trazo color verde; 20 Hz, trazo color morado) y en presencia de rianodina + tapsigargina (trazos color rojo). Los trazos fueron normalizados al pico de la respuesta en condiciones control.

Para confirmar que los depósitos intracelulares de calcio estaban vacíos, en estos experimentos, después de los trenes de estimulación eléctrica aplicamos cafeína (10 mM), que abre los receptores de rianodina, y no observamos incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la cafeína (Figura 11). Sin embargo, al aplicar nuevamente un tren de estimulación eléctrica a 20 Hz se observó un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ similar al observado en respuesta al tren de estimulación anterior. Esto muestra que el tratamiento con rianodina y tapsigargina elimina la fuente de calcio de los depósitos intracelulares, pero la entrada de calcio transmembranal a través de los canales dependientes de voltaje sigue activándose en respuesta a la estimulación eléctrica.

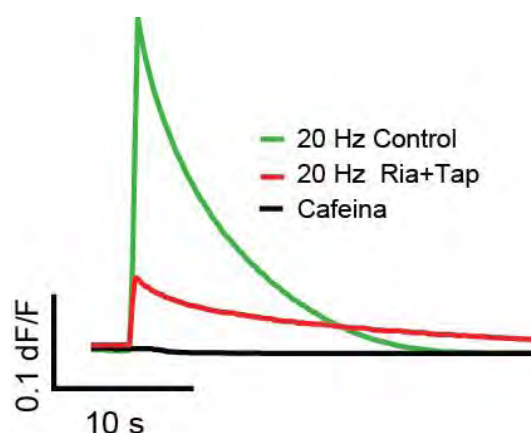


Figura 11.- La incubación con rianodina + tapsigargina vacía los depósitos intracelulares de calcio. Neuronas incubadas con rianodina + tapsigargina no presentan un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la estimulación con cafeína (trazo color negro).

Por otra parte, en respuesta a la estimulación a 20 Hz la señal de calcio se propagó de manera retrógrada hacia el centro del muñón axonal en condiciones control, pero se restringió a las áreas cercanas a la membrana cuando se vaciaron los depósitos intracelulares con la combinación de rianodina + tapsigargina (Figura 10B panel inferior y Figura 17A, trazo rojo). Esto sugiere que la liberación de calcio inducida por calcio no sólo incrementa la concentración de calcio, sino que además contribuye a su propagación.

De forma paralela, realizamos experimentos con neuronas en condiciones control (en ausencia de fármacos), a las que les aplicamos 4 trenes de estimulación a 1 Hz ó 20 Hz con un intervalo de 5 minutos entre ellos. El incremento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$, en respuesta a cada una de estas estimulaciones no fue significativamente distinto (Figura 12), lo cual muestra que la disminución en la amplitud del transitorio rápido de calcio observada en neuronas estimuladas a 20 Hz en los experimentos con rianodina y tapsigargina se debe al vaciamiento de los depósitos intracelulares y no al blanqueo del indicador de calcio o a un deterioro de las células.

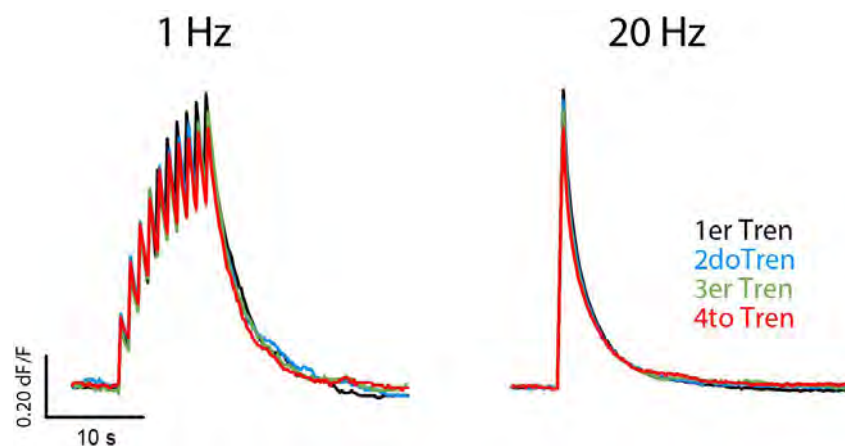


Figura 12.- La disminución en $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas incubadas con rianodina + tapsigargina no es producido por blanqueo del indicador de calcio ni por deterioro en las células. El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ es similar en respuesta a cuatro trenes consecutivos de impulsos a 1 Hz (izquierda) o 20 Hz (derecha) en ausencia de fármacos, con un intervalo de cinco minutos entre cada uno. Se utilizaron grupos independientes de células para cada frecuencia de estimulación.

Para los experimentos con dantroleno, después de observar el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a un tren de estimulación a 1 ó a 20 Hz en condiciones control, se agregó el fármaco al medio extracelular y se volvió a estimular 5 minutos después de la aplicación. El bloqueo de los receptores de rianodina con dantroleno produjo una

disminución de $48.58 \pm 4.9 \%$ en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la estimulación a 20 Hz (Figura 13, trazo naranja), pero no a 1 Hz (los datos no se muestran), similar a lo que ocurre al vaciar los depósitos con rianodina y tapsigargina. Sin embargo los experimentos con dantroleno ofrecen la ventaja de poder lavar el fármaco del medio extracelular y observar la recuperación en la amplitud del transitorio al $87.65 \pm 5.88 \%$ de la respuesta antes de la aplicación del fármaco (Figura 13, trazo verde aqua), mostrando que la disminución observada en presencia de dantroleno no se debió al deterioro de las neuronas ni al blanqueo del colorante.

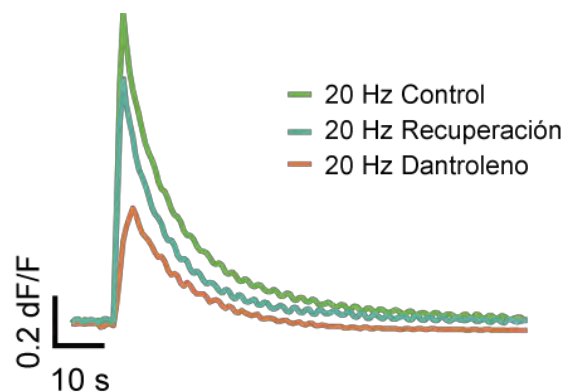


Figura 13.- El bloqueo de los receptores de rianodina con dantroleno es reversible. La incubación con dantroleno produjo una disminución del transitorio de Ca^{2+} de $48.58 \pm 4.9 \%$ (trazo color naranja), que se revirtió después de lavar el fármaco, recuperándose la respuesta en un $87.65 \pm 5.88 \%$ (trazo color verde aqua).

Estos resultados sugieren que la actividad eléctrica a bajas frecuencias activa principalmente la entrada de Ca^{2+} transmembranal, mientras que el disparo a altas frecuencias (20 Hz) activa además la liberación de calcio inducida por calcio, lo cual contribuye significativamente al incremento en el flujo de calcio hacia el citoplasma y a su propagación por el axoplasma. Presumiblemente, la acumulación de calcio en respuesta a la actividad eléctrica a altas frecuencias permite su difusión hacia los depósitos intracelulares, donde puede activar el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio mediado por los receptores de rianodina.

Participación de los canales de calcio tipo L en el transitorio rápido de Ca^{2+} .

Por su localización, la exocitosis de vesículas electrodensas está muy asociada a la actividad de los canales de calcio sensibles a voltaje tipo L (Mansvelder and Kits, 2000; Trueta et al., 2003), ya que estos canales se encuentran ubicados en sitios extrasinápticos, donde liberan su contenido las vesículas electrodensas. Por tal razón estudiamos la participación de estos canales en el transitorio rápido de Ca^{2+} y su contribución en la exocitosis en neuronas estimuladas a 20 Hz.

Para analizar la participación de los canales de calcio tipo L bloqueamos estos canales utilizando nimodipina (10 μ M) y estimulamos a las neuronas con un tren de impulsos a 20 Hz. En estas condiciones la amplitud del transitorio rápido de calcio disminuyó en $38.41 \pm 4.28\%$ con respecto a la obtenida en ausencia de nimodipina (Figura 14). El hecho de que el transitorio de calcio no se abolió por completo en presencia de nimodipina, sugiere que además de los canales tipo L hay otros tipos de canales de calcio sensibles a voltaje que permiten la entrada de calcio en respuesta a la estimulación, los cuales podrían estar ubicados presumiblemente en las zonas activas cercanas. Como era de esperarse, al añadir cadmio (0.2 mM) al medio extracelular para bloquear por completo los canales de calcio sensibles a voltaje, se bloqueó por completo el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 15, n=6) así como la exocitosis en respuesta a la estimulación a 20 Hz (los datos no se muestran).

A pesar de la disminución en la amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ en presencia de nimodipina, la señal se propagó de forma retrograda hacia el interior del muñón axonal (ver Figura 14B y Figura 17A, trazo color vino), sugiriendo que a pesar de no activarse los canales tipo L se sigue activando la liberación de calcio inducida por calcio.

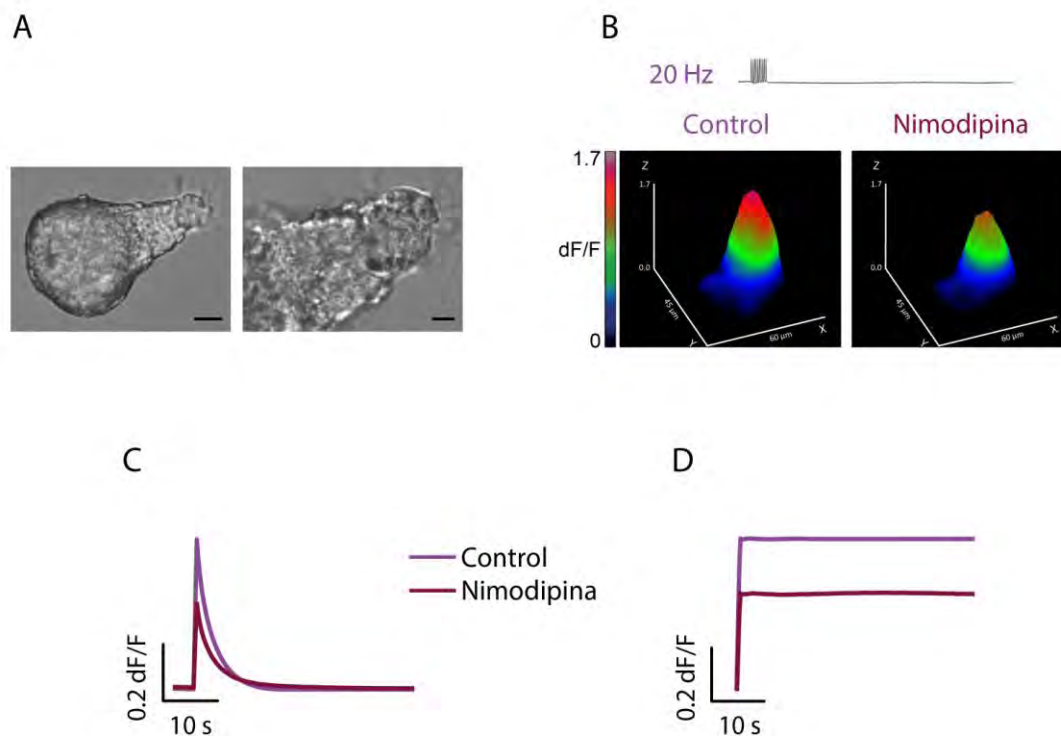


Figura 14.- El bloqueo de la entrada de calcio a través de los canales tipo L con nimodipina disminuye la $[Ca^{2+}]_i$ ante trenes de estimulación a 20 Hz. Efecto de la nimodipina sobre el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en el muñón axonal ante la estimulación a 20 Hz. A) Imágenes de transmisión de una neurona de Retzius enfocada con un objetivo 40X (panel izquierdo, barra escala 20 μ m) ó con un objetivo 100X (panel derecho, barra escala 5 μ m). B) Gráficas de superficie del aumento de fluorescencia en el muñón axonal de una neurona estimulada con un tren de diez impulsos a 20 Hz en ausencia (control) o presencia de nimodipina (10 μ M). Los ejes X y Y corresponden al área de adquisición de las imágenes y el eje Z es el valor de la intensidad de la fluorescencia (dF/F). C) Cinéticas de la fluorescencia (promedio de toda el área del muñón) en respuesta a la estimulación en ausencia (control, trazo morado) y en presencia de nimodipina (trazo color vino). D) Flujo acumulado de calcio hacia el citoplasma en respuesta a la estimulación en ausencia (control, trazo color morado) y en presencia de nimodipina (trazo color vino). Los trazos fueron normalizados al pico de la respuesta en condiciones control.

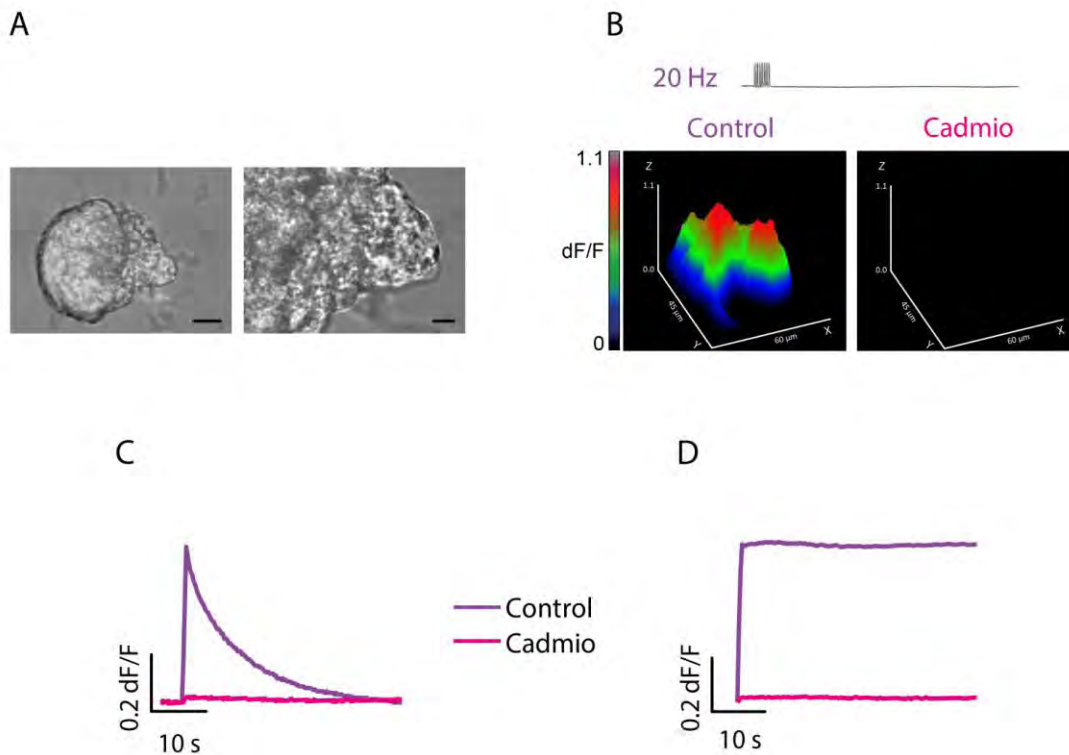


Figura 15.- El bloqueo de los canales de calcio sensibles a voltaje con cadmio abole el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ ante trenes de estimulación a 20 Hz. Efecto del cadmio sobre el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en el muñón axonal ante la estimulación a 20 Hz. A) Imágenes de transmisión de una neurona de Retzius enfocada con un objetivo 40X (panel izquierdo, barra escala 20 μm) ó con un objetivo 100X (panel derecho, barra escala 5 μm). B) Gráficas de superficie del aumento de fluorescencia en el muñón axonal de una neurona estimulada con un tren de diez impulsos a 20 Hz en ausencia (control) o presencia de cadmio (0.2 mM). Los ejes X y Y corresponden al área de adquisición de las imágenes y el eje Z es el valor de la intensidad de la fluorescencia (dF/F). C) Cinéticas de la fluorescencia (promedio de toda el área del muñón) en respuesta a la estimulación en ausencia (control, trazo morado) y en presencia de cadmio (trazo rosa). D) Flujo acumulado de calcio hacia el citoplasma en respuesta a la estimulación en ausencia (control, trazo morado) y en presencia de cadmio (trazo rosa). Los trazos fueron normalizados al pico de la respuesta en condiciones control.

Estos resultados sugieren que en respuesta a la estimulación a 20 Hz se activan más de dos fuentes de Ca^{2+} , a saber: canales de calcio tipo L, canales de calcio sensibles a voltaje No-L y la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, siendo esta última la más importante y no los canales sensibles a voltaje tipo L, como sucede en otros sitios de secreción extrasináptica. Además los resultados sugieren

que en ausencia de la activación de los canales tipo L, la entrada de calcio por otros tipos de canales sensibles a voltaje, posiblemente sinápticos, también activa la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares.

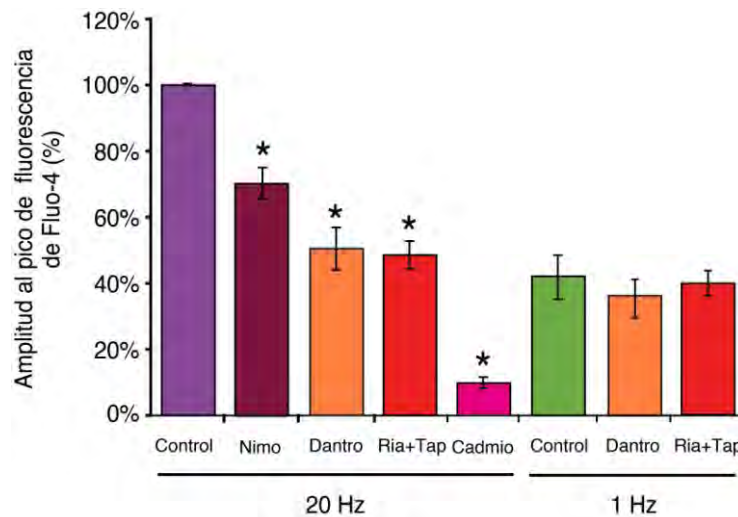


Figura 16.- Existen más de dos fuentes de Ca^{2+} participando en el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a una estimulación a alta frecuencia (20 Hz). Promedio de la amplitud máxima de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la estimulación a 1 y 20 Hz, en condiciones control y en presencia de los fármacos que bloquean las diferentes fuentes de Ca^{2+} (n=6 células en cada grupo). Los asteriscos muestran diferencias significativas para cada condición respecto a su propio control.

Contribución de la distintas fuentes de Ca^{2+} en la exocitosis.

¿Como se traducen las amplitudes de Ca^{2+} y la propagación del Ca^{2+} en la secreción? Debido a que los distintos tipos de canales sensibles a voltaje se encuentran distribuidos de manera diferencial en distintas regiones de las células, analizamos los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la exocitosis en diferentes áreas en el muñón axonal y sus cambios en presencia de los fármacos utilizados para bloquear diferentes fuentes de calcio. Para la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se analizó la fluorescencia de Fluo-4 en el tiempo en que la señal alcanzó su pico máximo en función de la distancia, a lo largo de un perfil trazado desde la punta del muñón hacia el soma, como se muestra en la imagen insertada en la Figura 17A.

Para el caso del FM1-43 se tomaron puntos fluorescentes ubicados en la punta del axón (ejemplificados esquemáticamente con círculos sólidos en la imagen de transmisión insertada en la Figura 17B) ó en áreas laterales del muñón (ejemplificados

esquemáticamente con círculos vacíos en la misma imagen), y analizamos las cinéticas de la fluorescencia en ambas regiones (Figura 17B).

El análisis de la $[Ca^{2+}]_i$ en función de la distancia desde la punta del muñón axonal en condiciones control, muestra que la señal de calcio intracelular producida por la estimulación a 20 Hz se propagó más lejos que la producida por la estimulación a 1 Hz. Por ejemplo, después de estimular a 1 Hz (Figura 17A, trazo verde), a 30 μ m de la punta ya no hay un incremento considerable de la $[Ca^{2+}]_i$; en contraste, después de estimular a 20 Hz (Figura 17A, trazo morado) a la misma distancia todavía hay un incremento del 50 % del que ocurre en la punta del muñón axonal.

Además este análisis muestra que durante las primeras 5 μ m existe una amplificación en la señal de calcio intracelular en respuesta a una estimulación a 20 Hz, la cual probablemente es producida por la liberación de calcio de depósitos intracelulares como el retículo endoplásmico. Estos resultados sugieren nuevamente que la estimulación a 20 Hz activa una fuente adicional de calcio, que no se activa a 1 Hz, y que permite que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ se propague.

Las cinéticas de secreción no fueron distintas en la punta y en sitios laterales del muñón axonal a la misma frecuencia de estimulación (1 ó 20 Hz) en condiciones control (Figura 17B, trazos grises para 20 Hz; trazos azules para 1 Hz). Las cinéticas de la fluorescencia de FM1-43 en respuesta a la estimulación a 1 Hz presentan, como se había mostrado previamente, una fase de exocitosis, mientras que las cinéticas en respuesta a 20 Hz presentan dos fases de exocitosis, en ambas regiones.

Al analizar la $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas incubadas con rianodina + tapsigargina y estimuladas a 20 Hz, observamos que se abolió la amplificación y la propagación del transitorio hacia el interior del axón (Figura 17A, trazo rojo). En estas condiciones la $[Ca^{2+}]_i$ se propagó de manera similar a la producida cuando las neuronas fueron estimuladas a 1 Hz. El vaciamiento de los depósitos intracelulares, disminuyó la amplitud de la primera fase de incremento en la fluorescencia de FM1-43 y abolió la segunda, tanto en las áreas de la punta como en áreas laterales del muñón axonal de neuronas estimuladas a 20 Hz (Figura 17 B, trazo rojo círculos sólidos para áreas de la punta y círculos vacíos para las áreas laterales). El incremento en la fluorescencia de FM1-43 en estas condiciones fue similar al observado ante una estimulación a 1 Hz (Figura 17B, trazos azules).

Por otra parte, al analizar la $[Ca^{2+}]_i$ en función de la distancia en neuronas estimuladas a 20 Hz en presencia de nimodipina, podemos observar que aunque la $[Ca^{2+}]_i$ que se alcanzó fue menor que en condiciones control, la señal se siguió propagando de manera retrógrada hacia el interior del muñón axonal (Figura 17A,

trazo vino). Las cinéticas de la fluorescencia de FM1-43 en neuronas estimuladas con trenes a 20 Hz tratadas con nimodipina, mostraron que el bloqueo de los canales tipo L disminuyó 64.14 ± 3.84 % la amplitud de la segunda fase de secreción en áreas laterales del muñón axonal (Figura 17B, trazos vino con círculos vacíos). Sin embargo, en la punta del muñón el bloqueo de los canales tipo L con nimodipina produjo únicamente una disminución del 44.67 ± 2.55 % en la amplitud de la segunda fase de secreción (Figura 17, trazo vino con círculos sólidos). Esto sugiere que en la punta del muñón axonal, cerca de las zonas activas sinápticas, la presencia de canales de Ca^{2+} no-L contribuyen en mayor medida a la entrada de Ca^{2+} y a la exocitosis extrasináptica. Algo que también es importante hacer notar es que las cinéticas de exocitosis en presencia de nimodipina presentaron un retraso de 22.33 ± 4.96 s en el inicio de la fase dinámica del incremento de la fluorescencia, sin importar la localización de las áreas analizadas (Figura 17B, marcado con una flecha roja). Esto podría deberse a que los canales de calcio tipo L se encuentran más cerca de las vesículas electrodensas en sitios extrasinápticos, que los no-L presentes en zonas activas, y al bloquear los canales tipo L el Ca^{2+} que entra por otros canales más alejados de las vesículas electrodensas requiere difundir hasta éstas, lo cual lleva más tiempo.

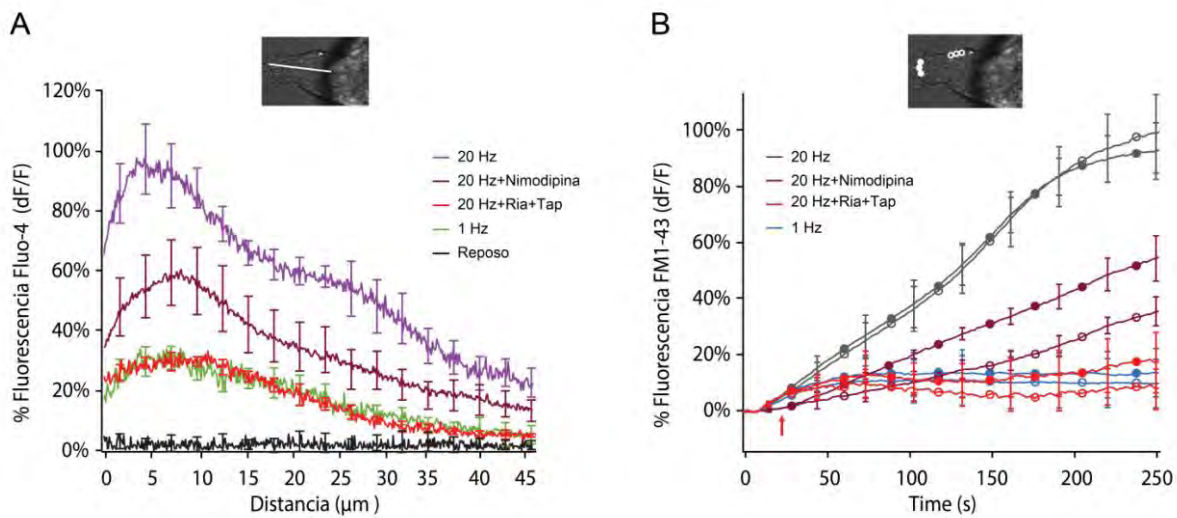


Figura 17.- La amplitud y la propagación de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la estimulación eléctrica, determinan la dinámica de secreción. A) $[Ca^{2+}]_i$ en función de la distancia en condiciones control en respuesta a la estimulación a 1 Hz (trazo color verde) y 20 Hz (trazo color morado), o en neuronas estimuladas a 20 Hz incubadas con rianodina + tapsigargina (trazo color rojo) o con nimodipina (trazo color vino). La imagen de transmisión insertada muestra el perfil que se trazó a lo largo del muñón axonal para medir la intensidad de la fluorescencia de Fluo-4 en función de la distancia desde su punta hacia el soma. La distancia cero representa la punta. B) Cinéticas de secreción en condiciones control en respuesta a la estimulación a 1 Hz (trazo azul) y 20 Hz (trazo gris) tomando para el análisis áreas en la punta del muñón (círculos sólidos) y áreas laterales (círculos vacíos), o en neuronas estimuladas a 20 Hz incubadas con rianodina + tapsigargina (trazos rojos, círculos sólidos (punta) ó círculos vacíos (laterales)) o en presencia de nimodipina (trazos vinos, círculos sólidos (punta) ó círculos vacíos (laterales)). Las cinéticas en presencia de nimodipina muestran un retraso en el incremento de la fluorescencia, marcado con una flecha roja. En la imagen de transmisión insertada se muestra cómo se tomaron las áreas en la punta y las áreas laterales para medir la intensidad de la fluorescencia de FM1-43.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que en respuesta a la estimulación a 1 Hz únicamente se activa la entrada de calcio por canales sensibles a voltaje, por lo que la propagación del calcio es limitada y sólo puede liberar su contenido la poza de vesículas que se encuentra cercana a la membrana plasmática (por ello la cinética de secreción muestra un incremento).

En respuesta a 20 Hz la señal de Ca^{2+} se amplifica y propaga gracias a la liberación de calcio inducida por calcio, lo que permite movilizar a las tres poblaciones vesiculares para liberar su contenido (por lo que la cinética de secreción muestra 2 incrementos). Si se estimula a la neurona a 20 Hz pero se vacían o bloquean los

depósitos intracelulares de Ca^{2+} ocurre únicamente la entrada de Ca^{2+} por canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje y entonces, al igual que con la estimulación a 1 Hz, sólo se fusionan con la membrana las vesículas ubicadas muy cercana de ésta (y ocurre únicamente 1 incremento en la fluorescencia de FM1-43). Por último, la estimulación a 20 Hz bloqueando los canales tipo L, produce una señal de Ca^{2+} que se sigue propagando, aunque menos que en condiciones control, y también con una amplitud menor, pero se pueden movilizar las 3 poblaciones vesiculares aunque en menor proporción.

Discusión

En este trabajo mostramos un mecanismo novedoso de secreción extrasináptica de serotonina que ocurre en el axón de las neuronas serotoninérgicas de Retzius. La secreción extrasináptica axonal muestra mecanismos intermedios entre la secreción sináptica y la extrasináptica somática, lo que expande las posibilidades de comunicación de una sola neurona serotoninérgica.

La secreción extrasináptica axonal se activa en respuesta a la estimulación a 1 Hz, que representa una frecuencia baja en comparación con las necesarias para activar la secreción extrasináptica en el soma, que requiere de la estimulación a frecuencias mayores que 5 Hz para activarse (Leon-Pinzon et al., 2014; Trueta et al., 2003). Esta dependencia de la frecuencia se encuentra fuertemente ligada a la distancia a la que se encuentran las vesículas secretoras con respecto a la membrana plasmática.

En el axón encontramos una poza de vesículas que se encuentra cerca de la membrana plásmática, a 70 ± 40 nm, en contraste con el soma, donde la población más periférica se ubica a una distancia promedio de 1.5 ± 0.2 μ m de la membrana (De-Miguel et al., 2012). Sin embargo, aunque la cercanía de esta población vesicular a la membrana plasmática permite que la secreción extrasináptica en el axón se active a bajas frecuencias, es necesaria una estimulación repetitiva, que permita la acumulación y difusión del calcio hasta los sitios donde se encuentran las vesículas, a diferencia de lo que ocurre en las terminales sinápticas, donde las vesículas se encuentran adosadas a la membrana y pueden fusionarse con ésta incluso en respuesta a un solo potencial de acción. De igual forma, la importancia de la distribución vesicular con respecto a la membrana plasmática y la dinámica de la movilización de las vesículas se ve reflejada en la latencia para el inicio de la secreción después de la estimulación eléctrica. La secreción axonal muestra una latencia de 15.76 ± 6.52 s, que es mucho menor que la observada en el soma, de 75.4 ± 20.3 s (Leon-Pinzon et al., 2014), pero mayor que la latencia en las terminales presinápticas, que es de unos pocos milisegundos.

La secreción es un proceso dependiente de calcio, y se requiere de este ión tanto para la movilización como para la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. La entrada de Ca^{2+} a través de los canales sensibles a voltaje es similar a lo largo de estimulaciones subsecuentes (Ross et al., 1987; Stewart et al., 1989). Debido a la presencia de proteínas amortiguadoras en el citoplasma que se unen al calcio y dificultan su difusión, y a ATPasas que movilizan al calcio fuera del citosol, el incremento en la concentración de calcio en respuesta a un impulso eléctrico ocurre

en un espacio muy limitado y dura poco tiempo (Llinás et al., 1995). En el axón de las neuronas de Retzius el transitorio rápido de Ca^{2+} en respuesta a una estimulación a 1 Hz, consistió en una sucesión de 10 picos, cada uno acoplado a un potencial de acción en el tren. A esta frecuencia, como los potenciales de acción se encuentran muy separados temporalmente entre sí (1 s), la entrada de Ca^{2+} en respuesta a un potencial de acción prácticamente es contrarestanda por los mecanismos de amortiguamiento antes de que ocurra el siguiente potencial de acción. Es por ello que en respuesta a un tren de estimulación a 1 Hz, el transitorio de Ca^{2+} en respuesta a cada impulso no presenta mucha suma temporal. Por el contrario, ante una estimulación repetitiva a altas frecuencias (20 Hz), los mecanismos de amortiguamiento del Ca^{2+} son sobrepasados porque la entrada de Ca^{2+} se activa de manera más frecuente (cada 50 ms), lo que ocasiona una suma lineal del Ca^{2+} que entra a través de los canales sensibles a voltaje en respuesta a cada impulso, produciendo un incremento muy rápido en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esta alta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ difunde en el citoplasma y activa a los receptores de rianodina, activando el mecanismo conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} .

Los receptores de rianodina tienen una gran sensibilidad al Ca^{2+} , que incrementa de manera sigmoide su probabilidad de apertura a concentraciones de Ca^{2+} entre 0.1 y 100 μM (Bezprozvanny et al., 1991). De esta manera, la suma temporal del Ca^{2+} que entra a través de la membrana plasmática se suma a su vez a la salida de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, produciendo una amplificación y propagación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el axoplasma, que permite la movilización de las pozas de vesículas distantes a la membrana plasmática. Es por ello que la frecuencia de disparo determina de manera indirecta el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y a su vez la dinámica de exocitosis.

En resumen, en respuesta a bajas frecuencias de estimulación (1 Hz) se activa únicamente la entrada de Ca^{2+} transmembranal, que produce un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de amplitud limitada y restringido a la zona submembranal, por lo que sólo liberan su contenido las vesículas que se encuentran cercanas a la membrana plasmática. En contraste, la estimulación repetitiva a altas frecuencias (20 Hz) además de la entrada transmembranal de Ca^{2+} activa la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} a partir de los depósitos intracelulares. Este mecanismo produce una amplificación y propagación del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, permitiendo que el Ca^{2+} llegue a los sitios en donde se encuentran las vesículas alejadas de la membrana plasmática y produciendo su movilización y posterior fusión con la membrana plasmática para liberar su contenido.

Por su localización, la exocitosis a partir de vesículas electrodensas está asociada a la actividad de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje tipo L (Mansvelder and Kits, 2000; Trueta et al., 2003), ya que estos canales se encuentran ubicados en sitios extrasinápticos, donde liberan su contenido éstas vesículas. Resultados previos de nuestro grupo de trabajo mostraron que la exocitosis a partir de vesículas electrodensas en el soma de las neuronas de Retzius depende en su totalidad de la activación de los canales de Ca^{2+} tipo L, ya que el bloqueo de estos canales con nimodipina inhibe por completo la secreción extrasináptica en respuesta a la actividad eléctrica (Trueta et al., 2003). Por el contrario, en este trabajo mostramos que en la exocitosis extrasináptica en el axón no participan únicamente los canales de Ca^{2+} tipo L, puesto que el bloqueo con nimodipina únicamente disminuyó la secreción en un 36%, más no la abolió. Además mostramos que aunque se bloqueen los canales de Ca^{2+} tipo L, la entrada de Ca^{2+} por otros tipos de canales permite que se active el mecanismo de liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. Posiblemente estos otros canales son los que forman parte del complejo de fusión en las terminales presinápticas (Reuter, 1996).

En nuestras condiciones experimentales de cultivo, las terminales sinápticas se forman en la punta del muñón del axón primario, lo que nos permite observar más claramente la participación de los canales de Ca^{2+} no-L y su contribución en la secreción extrasináptica axonal. En condiciones fisiológicas las terminales sinápticas no se encuentren tan cercanas a esta estructura como en el cultivo; sin embargo, es posible que el incremento en la concentración de calcio intracelular y la secreción extrasináptica axonal comiencen en los sitios cercanos a las terminales y posteriormente éste mecanismo podría irse autoregenerando y propagando a lo largo de todo el axón mediante la liberación de calcio inducida por calcio.

Por otra parte, también es importante mencionar que en nuestras condiciones experimentales de cultivo las células se encuentran aisladas en ausencia de una contraparte postsináptica, lo que podría modificar la ubicación de los canales de Ca^{2+} . Los canales sinápticos podrían estar fuera del sitio típico y estar localizados más cerca de los canales de Ca^{2+} tipo L, en sitios extrasinápticos. Además, la densidad de canales en el axón podría variar con respecto a la que hay en condiciones fisiológicas. En este sentido se ha reportado que las corrientes de cola de Ca^{2+} registradas en el axón de neuronas de Retzius aisladas son tres veces mayores que en el axón de las neuronas postsinápticas al formar una sinapsis en cultivo (Fernández de Miguel, et al., 1992; Cooper, et al., 1992). La disminución de la densidad de canales en las neuronas postsinápticas parece participar en el control del crecimiento de neuritas o

ramificaciones (Cooper, et al., 1992). Sin embargo, las corrientes de Ca^{2+} registradas en el axón de la neurona presináptica no presentan cambios significativos después de la formación de una sinapsis en cultivo, por lo que posiblemente las condiciones para la exocitosis axonal sean similares en neuronas aisladas que en neuronas presinápticas en condiciones fisiológicas.

En resumen, en la secreción extrasináptica axonal, la fuente más importante de Ca^{2+} son los depósitos intracelulares, ya que es la que permite que la señal de Ca^{2+} iniciada por la actividad eléctrica se amplifique y propague hacia los sitios en donde se encuentran las vesículas electrodensas alejadas de la membrana plasmática, permitiendo que éstas puedan movilizarse para su posterior fusión. El mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} puede activarse incluso sin la activación de los canales de Ca^{2+} tipo L, aunque sí es indispensable la participación de algún canal de Ca^{2+} activado por voltaje.

Los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , como el retículo endoplásmico, pueden por un lado contribuir en la recuperación de la concentración basal de calcio después de un incremento transitorio en respuesta a la actividad eléctrica, al capturar una cantidad significativa del Ca^{2+} que entra al citoplasma a través de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje (Markram et al., 1995; Fierro et al., 1998). Por otro lado estos depósitos intracelulares pueden liberar Ca^{2+} y así al amplificar el incremento de la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la actividad eléctrica (Sandler and Barbara, 1999). En el axón de las neuronas de Retzius el vaciamiento del retículo endoplásmico con ácido ciclopiazónico (CPA; un bloqueador de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y sarcoplásmico ; Seidler et al., 1989) produce una elevación transitoria del Ca^{2+} citoplasmático, lo cual muestra que en este compartimento el retículo endoplásmico es un depósito de calcio intracelular funcional. Los transitorios de Ca^{2+} en respuesta a la estimulación con un potencial de acción en el axón no son modificados en su amplitud por el tratamiento con CPA, pero sí tienen una recuperación más lenta (Beck, et al., 2001). Estos resultados apoyan la idea de que la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} a partir de los depósitos intracelulares no se activa en respuesta a un solo potencial de acción, pero muestran que el retículo endoplásmico podría estar participando en acelerar la recuperación de la concentración basal de Ca^{2+} , incluso en respuesta a un solo impulso. Nuestros resultados también muestran que la liberación de calcio intracelular únicamente se activa en respuesta a la estimulación a frecuencias altas, pero la participación del retículo endoplásmico en la recuperación del calcio sí ocurre también en respuesta a

la estimulación a baja frecuencia, ya que en presencia de rianodina y tapsigargina la caída de los transitorios de calcio fue más lenta con ambas frecuencias de estimulación (ver Figura 10C).

A diferencia de la liberación de neurotransmisores a partir de las terminales presinápticas, en donde las vesículas están adosadas a la membrana plasmática y liberan su contenido en microsegundos después de la entrada de calcio (Llinás et al., 1995), la secreción extrasináptica, que ocurre a partir de varias pozas de vesículas ubicadas a diferentes distancias de la membrana, tiene un curso temporal mucho más lento, que puede durar varios minutos (para revisión ver Trueta and De-Miguel, 2012). Esto requiere también de un incremento prolongado de la concentración de calcio intracelular que permita la fusión con la membrana de las vesículas que van llegando paulatinamente. En el soma de las neuronas de Retzius esto ocurre mediante un mecanismo de retroalimentación positiva en el que la serotonina liberada actúa sobre autorreceptores acoplados a la fosfolipasa C y a la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, la cual produce una elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cerca de la membrana, que permite la fusión de las vesículas que van llegando a ésta (Leon-Pinzon et al., 2014).

La larga duración de la exocitosis extrasináptica en el axón de las neuronas de Retzius posterior al periodo de estimulación eléctrica y su acortamiento al vaciar los depósitos intracelulares de calcio sugiere que este mecanismo de retroalimentación también es el responsable de sostener la liberación en el axón. El ciclo de retroalimentación positiva activado por la serotonina asegura que todas las vesículas que fueron movilizadas por el transitorio rápido de Ca^{2+} lleven a cabo la exocitosis, pero no produce la movilización de más vesículas, por lo que termina cuando se libera la serotonina de las últimas vesículas que se movilizaron hacia la membrana plasmática. Un mecanismo similar sostiene la exocitosis de oxitocina en las dendritas de neuronas hipotalámicas, donde la activación de autoreceptores de oxitocina eleva la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y activa la exocitosis de más oxitocina a partir de vesículas electrodensas (Lambert et al., 1994; Ludwig and Leng, 2006; Neumann et al., 1996). Por lo tanto, una maquinaria similar a la que actúa en la liberación extrasináptica en las neuronas de Retzius podría producir la exocitosis somática en células nerviosas y otros tejidos, incluyendo los de los mamíferos.

En el soma de las neuronas de Retzius, la supresión del mecanismo de retroalimentación positiva utilizando metisergida, un bloqueador inespecífico de los receptores de serotonina, abole por completo el incremento en la intensidad de la

fluorescencia de FM1-43 (Leon-Pinzon et al., 2014), debido a que el número de vesículas que se encuentran cercanas a la membrana y que liberan su contenido directamente en respuesta a la estimulación es muy pequeño, por lo que no pueden ser detectadas utilizando este método. La primera población de cúmulos de vesículas se encuentra a $1.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ de la membrana plasmática, por lo que para movilizarla es indispensable que se active el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio, que amplifica la señal de Ca^{2+} y la propaga hasta los sitios en donde se encuentran esas vesículas. Además, cuando estas vesículas alcanzan la membrana plasmática, el transitorio rápido de calcio producido por la estimulación eléctrica ya terminó, por lo que el mecanismo de retroalimentación positiva iniciado por las primeras vesículas que liberaron serotonina es indispensable para la fusión de las vesículas que se movilizaron. En contraste, en el axón, al suprimir la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares con una combinación de rianodina y tapsigargina, la secreción no se abolió, sino que únicamente se redujo su duración, acotándose al tiempo que duró el transitorio rápido de Ca^{2+} , independientemente de la frecuencia de estimulación. Esto se debe a que en el axón existe una población de vesículas que se encuentra cercana a la membrana plasmática ($70 \pm 40 \text{ nm}$), y que no requiere de la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares para moverse ni para fusionarse; las demás poblaciones vesiculares, que se encuentran más alejadas de la membrana plasmática, sí requieren de esta fuente de calcio tanto para moverse (liberación de calcio inducida por calcio), como para fusionarse (mecanismo de retroalimentación positiva), tal y como ocurre en el soma. Por ello cuando se vacían los depósitos intracelulares de Ca^{2+} y estas poblaciones vesiculares no se movilizan, la secreción ocurre únicamente a partir de la poza más cercana a la membrana y en consecuencia dura mucho menos tiempo.

Es importante resaltar que mientras que en el soma (Leon-Pinzon et al., 2014) y en el axón los autoreceptores promueven la liberación de serotonina, en las terminales presinápticas de estas mismas neuronas los autoreceptores serotoninérgicos disminuyen la excitabilidad local mediante la activación de canales de cloro, que producen un cortocircuito que dificulta la llegada de potenciales de acción subsecuentes a las terminales (Cercós et al., 2009). Esto muestra que así como los mecanismos de secreción de serotonina en los diferentes compartimentos de una misma neurona son distintos, de igual forma los mecanismos de autorregulación que activa la serotonina para modular su propia liberación mediante circuitos de retroalimentación, son distintos en los diferentes compartimentos e independientes entre sí.

Las diferencias en los mecanismos de regulación de la secreción de serotonina en cada compartimento neuronal se correlacionan a su vez con el curso temporal y con las funciones a las que está asociado a cada tipo de secreción. La serotonina liberada de las terminales sinápticas produce efectos muy rápidos y locales en circuitos con conexiones específicas, donde el curso temporal de la transmisión está muy ligado al patrón temporal de disparo de la neurona presináptica, por lo que una vez que se lleva a cabo esa respuesta rápida, ésta también es frenada lo más rápidamente posible. Por el contrario, la liberación extrasináptica somática tiene efectos de modulación difusa y lenta, regulando posiblemente circuitos neuronales enteros, y la difusión en un volumen grande requiere de la secreción masiva de grandes cantidades de serotonina, por lo que esta liberación necesita ser mantenida por periodos largos de tiempo.

Por otro lado, debido a las características de la secreción extrasináptica axonal que mostramos en este trabajo, es probable que este tipo de secreción tenga efectos importantes en la modulación paracrina al nivel de circuitos locales en el sistema nervioso, que serían más lentos y difusos que los de la liberación sináptica, pero más rápidos y locales que los de la liberación somática. Esta podría ser una forma muy importante de producir modulación al nivel de circuitos específicos en todo el sistema nervioso de los vertebrados, ya que en éste, las proyecciones axonales de las neuronas serotoninérgicas inervan prácticamente todas las áreas del sistema nervioso central (Jacobs and Azmitia, 1992), mientras que los somas se encuentran restringidos a los núcleos del raphé, y por ello es posible que la serotonina secretada por éstos no alcance muchas áreas del sistema nervioso.

La secreción extrasináptica axonal de serotonina muestra mecanismos intermedios entre la sináptica y la somática y podría producir modulación paracrina de circuitos neuronales más rápida y localizada que la secreción somática, expandiendo las posibilidades de comunicación de una sola neurona serotoninérgica, que dependen del sitio en que ocurre la secreción. Esta complejidad permite que pocas neuronas regulen múltiples funciones en distintas regiones del sistema nervioso de manera diferencial.

Conclusiones

La secreción extrasináptica axonal presenta características intermedias entre la secreción sináptica y la somática. Se puede activar desde bajas frecuencias de estimulación (1 Hz), pero el curso temporal de la liberación dura varios minutos por lo que depende de un mecanismo de retroalimentación positiva producido entre la serotonina secretada y el calcio liberado de los depósitos intracelulares. Una característica remarcable de la liberación extrasináptica axonal es que la fuente de calcio más importante para la secreción en el axón son los depósitos intracelulares y no los canales tipo L, como en otros sitios de secreción extrasináptica y sugiere que la entrada de calcio por otros tipos de canales, posiblemente sinápticos, también activa esta fuente de calcio.

APÉNDICE

Citoesqueleto

El citoesqueleto es una red tridimensional constituida por proteínas que provee soporte interno en las células eucariotas, organiza las estructuras internas e interviene en los fenómenos de transporte y división celular. Las proteínas que conforman el citoesqueleto se organizan para formar 3 estructuras principales: microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos. Cada una de estas estructuras tiene distintas propiedades mecánicas y dinámicas (Bear, 2001). Las proteínas que conforman al citoesqueleto son altamente dinámicas, capaces de polimerizarse y despolimerizarse y poseen gran capacidad de movimiento en el citoplasma con una escala de tiempo que va de segundos a minutos.

Microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras tubulares de 20-25 nm de diámetro (Desai and Mitchison, 1997), formados de protofilamentos paralelos, los cuales están formados a su vez por heterodímeros de α y β tubulina alternados. Cada microtúbulo está compuesto de 13 protofilamentos. La disposición de los heterodímeros de α y β tubulina le confieren al microtúbulo una estructura polarizada. Las diferentes tasas de polimerización de los dos extremos de los microtúbulos son consecuencia de su polaridad; el extremo de polimerización rápida es el positivo (+), y el extremo de polimerización lenta es llamado extremo negativo (-). Los microtúbulos intervienen en diversos procesos celulares que involucran la división celular (mitosis y meiosis), ya que forman el huso acromático y constituyen la estructura interna de cilios y flagelos. Existen una gran variedad de proteínas con dominios de unión a los microtúbulos que contribuyen a la regulación de sus funciones. Éstas pueden agruparse en dos clases principales: 1) motores moleculares como las cinesinas y dineínas, que llevan a cabo el transporte intracelular de organelos y vesículas desde los cuerpos neuronales hasta los sitios de secreción. Los microtúbulos funcionan como un sistema de andamiaje para este transporte y la polaridad del microtúbulo es central para la función de los motores moleculares que utilizan la hidrólisis de ATP para moverse unidireccionalmente a lo largo del microtúbulo; 2) proteínas estructurales como la catenina y proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), éstas últimas son fosfoproteínas y su grado de fosforilación determina muchas de las funciones dinámicas de los microtúbulos; están involucradas en la modulación de la polimerización, la estabilidad y el arreglo de los microtúbulos en el citoplasma

(Sánchez et al., 2000).

Las MAP's y los motores moleculares (cinesinas y dineínas) se unen al mismo dominio carboxilo terminal de los microtúbulos. Así, las MAP's pueden interferir con la asociación de los motores moleculares con los microtúbulos e inhibir el transporte de organelos, por lo que es probable que una de las funciones que las MAP's pueden tener sea la de modular el transporte de organelos (Sánchez et al., 2000). Además, las MAP's también pueden presentar asociaciones con otras proteínas del citoesqueleto, como la actina, modificando su grado de estabilidad y rigidez (Sánchez et al., 2000). Existe evidencia de que los microfilamentos de actina y los microtúbulos forman redes tridimensionales por la unión con varias proteínas M's. Esta capacidad de formar redes de las MAP's se inhibe cuando son fosforiladas (Pollard et al., 1984).

Filamentos intermedios

Son filamentos de proteína fibrosa de unos 12 nm de diámetro, que constituyen los componentes del citoesqueleto más estables (dando soporte a los organelos por sus fuertes enlaces) y más heterogéneos. Las proteínas que conforman estos filamentos, citoqueratina, vimentina, neurofilamentos, desmina y proteína fibrilar ácida de la glía, son dependientes del tejido en el que se encuentran. Su función principal es la de organizar la estructura tridimensional interna de la célula.

Microfilamentos

Los microfilamentos tienen un diámetro entre 3 y 7 nm y están compuestos por dos cadenas de actina, que forman una hélice. La actina es una proteína globular de 43 kDa, altamente conservada en la escala evolutiva, presenta un sitio de unión a ATP y existe en dos formas: el monómero de actina globular (actina G), y los filamentos de actina (actina F), la cual se polimeriza en presencia de ATP, formando dobles hélices. Para que se lleve a cabo la polimerización el ATP debe hidrolizarse a ADP, liberando la energía necesaria para el proceso. La actina presenta polaridad, y tiende a polimerizarse y despolimerizarse a gran velocidad por el extremo positivo (+), y a menor velocidad por el extremo negativo (-) (Welch and Mullins, 2002). Su mayor concentración se encuentra justo por debajo de la membrana plasmática, porque una de sus funciones es mantener la forma de la célula. Otras funciones son la formación

de protuberancias citoplasmáticas como pseudópodos, participa en las uniones intercelulares o de células con la matriz, en la transducción de señales, en la formación de un anillo contráctil que divide la célula en dos y en la movilidad celular. El motor molecular que utiliza como andamiaje a los microfilamentos de actina es la miosina, que también convierte la energía química de la hidrólisis de ATP en trabajo mecánico para generar movimiento (Brown, 1999).

Citoesqueleto y secreción.

El citoesqueleto tiene un papel fundamental en el transporte intracelular de organelos y vesículas desde el aparato de Golgi a los sitios de exocitosis en la membrana plasmática.

El citoesqueleto de actina puede desempeñar múltiples funciones, incluso opuestas, sobre las vesículas secretoras (Eitzen, 2003; Gutiérrez, 2012; Malacombe et al., 2006; Muallem et al., 1995; Nightingale et al., 2012; Sokac and Bement, 2006). Las dos funciones principales del citoesqueleto de actina son: 1) actúa como un freno para mantener a las vesículas secretoras alejadas de la membrana plasmática en condiciones de reposo. En las terminales, las vesículas de la poza de reserva se encuentran unidas al citoesqueleto mediante proteínas llamadas sinápsinas (Greengard et al., 1993a; Huttner et al., 1983). Cuando las sinapsinas son fosforiladas, disminuyen su afinidad por la actina y por las vesículas (Benfenati et al., 1989; Chi et al., 2003; Hosaka et al., 1999; Huttner et al., 1983; Jovanovic et al., 1996; Schiebler et al., 1986; Sihra et al., 1989), liberando a éstas de su anclaje y permitiendo su movilización. Pero en condiciones de reposo se ha mostrado que también el citoesqueleto puede formar una corteza de actina que actúa como una barrera física funcional, impidiendo que las vesículas puedan fusionarse con la membrana plasmática. Es respuesta a la estimulación ocurre un cambio en la dirección de los filamentos de actina formando huecos en que permiten que las vesículas secretoras puedan entrar en contacto con la membrana plasmática (Eitzen, 2003; Gutiérrez, 2012; Malacombe et al., 2006; Torres-Platas et al, en preparación); 2) durante la activación de la exocitosis desempeña un papel activo proporcionando rieles para dirigir a las vesículas hacia los sitios de liberación, regulando el poro de fusión y proporcionando la fuerza impulsora para completar la fusión (Masedunskas et al., 2012; Nightingale et al., 2012; Sokac and Bement, 2006).

En la secreción sináptica, que tiene un curso temporal rápido (del orden de microsegundos a milisegundos), las sinapsinas unen a las vesículas secretoras con elementos del citoesqueleto de actina actuando principalmente como barrera funcional en condiciones de reposo al impedir que las vesículas se movilicen hacia la membrana plasmática, por el contrario en respuesta a la estimulación facilita el acoplamiento de las vesículas claras pequeñas con la membrana plasmática. Sin embargo, en la secreción somática, cuyo curso temporal es lento (segundos a minutos), como las vesículas secretoras se encuentran muy alejadas de la membrana plasmática, el citoesqueleto desempeña un papel fundamental en la movilización de las vesículas por medio de motores moleculares que se desplazan por rieles de tubulina y actina para su posterior fusión con la membrana plasmática. En células cromafines se ha mostrado que existe una corteza de actina en la zona sub-membranal (Aunis et al., 1979; Nakata and Hirokawa, 1992; Oheim and Stühmer, 2000; Plattner et al., 1997; Rosé et al., 2002), que ha sido marcada con anticuerpos anti-actina acoplados a oro y se ha visualizado por medio de microscopía electrónica (Rosé et al., 2002). En éstas células la fase tardía de la secreción está mediada por dichas proteínas del citoesqueleto de actina que se encargan del movimiento de las vesículas. Al inhibir la polimerización de los inhibir los filamentos de actina y los motores moleculares, la secreción se bloquea (Giner et al., 2005). De igual forma en las neuronas de Retzius de la sanguijuela se ha mostrado por inmunofluorescencia la presencia de una banda de actina adyacente a la membrana plasmática con un grosor de aproximadamente 4 μm , una segunda banda en la periferia del núcleo y una tercera intermedia entre las dos anteriores (Torres-Platas et al, en preparación). En éstas células también se ha mostrado que la inhibición de la polimerización de los microtúbulos, con colchicina, impide la secreción de serotonina en el soma (De-Miguel et al., 2012).

La esquizofrenia y la secreción de neurotransmisores.

La esquizofrenia (SCZ) es un trastorno neuropsiquiátrico crónico, caracterizado por alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento, incapacidad de sentir placer o expresar las emociones, problemas de memoria de trabajo y falta de atención (Rački et al., 2016; Woo, 2014). Tiene un impacto muy importante en los individuos y sus familias, ya que conduce a resultados funcionales pobres en múltiples ámbitos, incluido el empleo, la independencia de la vida y el funcionamiento social (Joseph et al., 2017). El origen de ésta enfermedad es multifactorial y afecta principalmente a jóvenes y adultos jóvenes (Arnold and Rioux, 2001). Se ha demostrado que en

algunas enfermedades mentales como la esquizofrenia existe una desregulación en la neurotransmisión, en particular en los sistemas dopaminérgico, glutamatérgico y GABAérgico (Chiapponi et al., 2016; Fusar-Poli and Meyer-Lindenberg, 2013; Iasevoli et al., 2014). Entre estas alteraciones, los estudios de imágenes cerebrales han mostrado que existe una mayor actividad del sistema dopaminérgico, lo que sugiere que la secreción de dopamina podría verse exacerbada en el cuerpo estriado de los pacientes (Abi-Dargham et al., 1998; Breier et al., 1997; Laruelle et al., 1999). Asimismo, las neuronas derivadas de células madre pluripotenciales (hiPSC) de pacientes esquizofrénicos muestran una mayor secreción de catecolaminas en respuesta a la actividad eléctrica (Hook et al., 2014). Aparte de esta información, se sabe poco sobre la secreción de los neurotransmisores en el sistema nervioso de pacientes con SCZ. Estudios *post mortem* sugieren que en los pacientes con SCZ hay alteraciones en la expresión de las proteínas SNARE involucradas en el mecanismo presináptico de fusión y liberación del contenido vesicular, y en proteínas como la sinapsina, que unen a las vesículas con componentes del citoesqueleto para evitar que las vesículas puedan moverse hacia la membrana plasmática (Egbujo et al., 2016). Sin embargo, no se había hecho una medición directa de la secreción de neurotransmisores en las neuronas del sistema nervioso central de humanos. Las anomalías estructurales y funcionales en el cerebro de los pacientes con SCZ se extienden desde la corteza hasta la periferia del sistema olfatorio y se ha reportado una disfunción en el olfato como una característica clínica de la enfermedad (Turetsky et al., 2009). En este sentido, el neuroepitelio olfatorio humano ofrece nuevas posibilidades de información sobre la etiopatogenia de la esquizofrenia, ya que a partir de este tejido pueden obtenerse precursores neuronales mediante un procedimiento no invasivo en adultos (Benítez-King et al., 2011). Este tejido contiene células madre que proliferan a lo largo de la vida y se diferencian para reemplazar neuronas sensoriales que se han perdido por factores ambientales (Graziadei and Graziadei, 1979; Hahn et al., 2005). Estos precursores neuronales olfatorios (ONPs) tienen perfiles de expresión génica similares a los de las células madre mesenquimales y de las células fetales derivadas del cerebro y pueden propagarse selectivamente en cultivo, donde se diferencian pasando por las diferentes etapas del neurodesarrollo (Calof et al., 2002), lo que permite el estudio de las moléculas que participan en este proceso (Benítez-King et al., 2011; Calof and Chikaraishi, 1989; McCurdy et al., 2005; Zhang et al., 2004, 2006). Dado que la esquizofrenia podría tener su origen durante el desarrollo embrionario, los ONPs también pueden ser útiles para caracterizar condiciones o sustancias que pueden contribuir a la futura aparición de esta enfermedad durante el desarrollo fetal del cerebro (Horiuchi et al., 2013).

Recientemente en nuestro grupo de investigación demostramos que los ONPs clonados de un sujeto sano llevan a cabo exocitosis extrasináptica a partir del soma y los axones, y que la melatonina aumenta la cantidad y la velocidad de dicha secreción (Galván-Arrieta et al., 2017), lo que indica que además de estimular la conectividad estructural de las neuronas, esta indolamina también mejora la comunicación neuronal a través de la secreción. En este trabajo estudiamos la secreción producida por la estimulación con alto K^+ en ONPs en cultivo primario obtenidos de un paciente con esquizofrenia (SCZ) y la comparamos con la secreción en los ONPs en cultivo primario de un sujeto control saludable (HCS). Además analizamos el papel de la melatonina en la secreción de los pacientes con SCZ y lo comparamos con el papel que tiene la melatonina en la secreción de los HCS.

Caracterización de la presencia de vesículas secretoras y de la secreción dependiente de calcio evocada por alto K^+ en precursores neuronales olfatorios humanos (ONPs).

Para estudiar la secreción en los ONPs, primero determinamos si estos precursores neuronales contienen vesículas secretoras, mediante la inmunotinción contra VAMP 1/2, una proteína de membrana asociada a las vesículas, que participa en la fusión vesicular con la membrana plasmática durante el proceso de exocitosis, y se ha usado como marcador de las vesículas secretoras. Como se muestra en la Figura 1A, se detectó marca positiva de VAMP 1/2 en los cultivos primarios de ONPs derivadas de HCS y de pacientes con SCZ. La tinción muestra un patrón puntiforme (Figura 1A), que es característico de las estructuras vesiculares (Goodall et al., 1997). En algunas células, la marca de VAMP parece estar ampliamente distribuida en el citoplasma, mientras que en otras la marca parece estar más densamente distribuida en la zona perinuclear (marcado con flechas blancas). También se observó marca inmunofluorescente en algunas proyecciones celulares (marcado con puntas de flecha blancas). Una vez que determinamos la presencia de vesículas secretoras mediante el inmunomarcaje de VAMP 1/2, estudiamos las características de la secreción de estas células despolarizándolas con alto potasio (K^+ ; 30 mM) y midiendo el incremento en la fluorescencia emitida por el colorante FM1-43. El colorante FM1-43 es un compuesto lipofílico que fluoresce únicamente cuando se pone en contacto con membranas lipídicas. Cuando las vesículas secretoras se fusionan con la membrana plasmática hay más superficie de membrana expuesta al colorante y por lo tanto hay un aumento en la intensidad de la fluorescencia (Betz y Bewick, 1992). En la Figura 1B se

muestran trazos representativos del incremento en la fluorescencia de FM1-43 en función del tiempo (representadas como dF/F), antes y después de la despolarización con alto K^+ (trazos negros). Este incremento no se observó cuando únicamente se realizó una estimulación mecánica al añadir al medio extracelular una solución fisiológica de Hanks (trazos verdes), y tampoco cuando las células se despolarizaron con alto K^+ en presencia de un quelante de Ca^{2+} (EGTA) al medio extracelular (trazos rosas). Por lo tanto el aumento en la fluorescencia refleja exocitosis, que es un proceso dependiente de Ca^{2+} que requiere un estímulo despolarizante. El aumento de la fluorescencia de FM1-43 inducido por la despolarización fue transitorio, presumiblemente debido al fotoblanqueo causado por la iluminación repetitiva para la adquisición de las secuencias de imágenes. Analizamos la amplitud máxima y la fase de subida del aumento, como mediciones indirectas de la cantidad y la velocidad de la secreción, respectivamente.

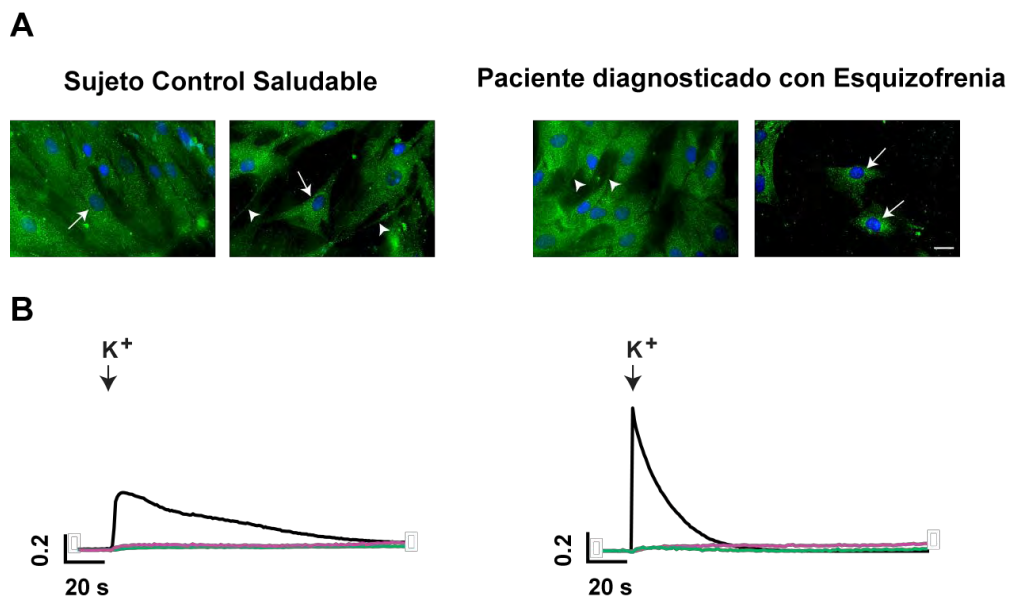


Figura 1.- Caracterización de las vesículas secretoras mediante inmunotinción con VAMP 1/2 y la evaluación de la secreción. Se realizaron cultivos primarios de los precursores neuronales olfatorios (ONPs) obtenidos a partir de un sujeto control saludable (HCS) y de un paciente diagnosticado con esquizofrenia (SCZ), hasta el pasaje 5 antes de la inmunotinción o la evaluación de la secreción. A) Imágenes representativas de los ONPs de un sujeto HCS (izquierda) y uno diagnosticado con SCZ (derecha), teñidos con un anticuerpo contra VAMP 1/2, seguido por un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (FITC). Barra de escala: 10 μ m; B) Trazos representativos de las cinéticas de la fluorescencia de FM1-43, en respuesta a la despolarización con alto potasio (K^+) de HCS (izquierda) y un sujeto diagnosticado con SCZ (derecha). El tiempo de la estimulación con K^+ se indica con una flecha

negra que apunta hacia abajo. El aumento en la fluorescencia refleja exocitosis. Los trazos de color rosa representan la respuesta de las células despolarizadas con alto K^+ , en presencia de un quelante de calcio (EGTA), para prevenir la exocitosis. Los trazos verdes representan la respuesta de las células estimuladas mecánicamente al estimular añadiendo únicamente solución una fisiológica de Hank.

Comparación de la secreción extratrasináptica de los ONPs derivados de un sujeto control saludable (HCS) y un paciente diagnosticado con esquizofrenia (SCZ) y los efectos de la melatonina en dicha secreción.

Previamente demostramos que la melatonina es un factor importante que regula el neurodesarrollo, y su déficit probablemente está asociado con la etiología de la esquizofrenia (Galván-Arrieta, 2017). Por lo tanto, lo primero que estudiamos aquí fue si la secreción se encuentra alterada en las células del paciente y posteriormente estudiamos los efectos de la melatonina en esa secreción. La Figura 2A muestra cinéticas representativas de la fluorescencia de FM1-43 (expresadas como dF/F) antes y después de la despolarización con alto K^+ de los ONPs obtenidos de un HCS (izquierda) o de un paciente diagnosticado con SCZ (derecha), tratados durante 12 hrs con melatonina 10^{-5} M (MEL, trazos morados) o únicamente con el vehículo (etanol 0.001%) (VEH, trazos negros). Aunque la amplitud de la fluorescencia y la cinética de la secreción muestran una alta variabilidad entre las células estimuladas en las mismas condiciones, los resultados muestran que la secreción en los ONPs tratados con VEH del paciente diagnosticado con SCZ tienen amplitudes más grandes y fases de subida más rápidas que los ONPs del HCS (Figura 2A; trazos negros en el panel izquierdo comparadas con los trazos negros en el panel derecho). El aumento de la fluorescencia tuvo un rango de duración total entre 81 y 288 s, con amplitudes y cinéticas variables. La pendiente de la fase de subida del incremento de la fluorescencia nos proporciona la velocidad de la exocitosis, el tiempo al pico nos indica la duración de este proceso, y la amplitud máxima del incremento nos da una medición indirecta de la cantidad de vesículas fusionadas, que a su vez refleja la cantidad de secreción. Los incrementos de la fluorescencia tuvieron picos de entre 0.8% y 178% por encima del nivel de fluorescencia basal (0.008-1.788 dF/F), y los tiempos de incremento fueron entre 1 y 96 s, lo que refleja de nueva cuenta una alta variabilidad de la secreción en términos de duración y velocidad. La cinética lenta y duradera del incremento de la intensidad de la fluorescencia de FM1-43 sugiere que la exocitosis en los ONPs es extratrasináptica. La Figura 2 muestra gráficas de barras de la media + ESM de la amplitud (B) y de la primera derivada del incremento de la fluorescencia FM1-43

(C), que reflejan la cantidad y la velocidad de secreción, respectivamente, en ONPs de HCS (izquierda) y de un paciente diagnosticado con SCZ (derecha), incubados con el VEH (negro) o con MEL (morado). Como los datos no muestran una distribución normal, utilizamos estadística no paramétrica para comparar estas características entre los grupos. Los insertos en la Figura 2B, C muestran los diagramas de caja que representan el percentil 25, la mediana y el percentil 75 de la cantidad y la velocidad de secreción, respectivamente. Cuando las células se trataron con MEL, los ONPs derivadas de HCS mostraron una tendencia a aumentar la cantidad y la velocidad de secreción, pero curiosamente, la melatonina disminuyó estos parámetros en los ONPs derivados de pacientes con SCZ.

Nuestros resultados muestran que existe una secreción exacerbada en los ONPs derivados del paciente diagnosticado con SCZ, y que el tratamiento con melatonina contrarresta esa secreción aumentada en los ONPs derivados de SCZ (Figura 2).

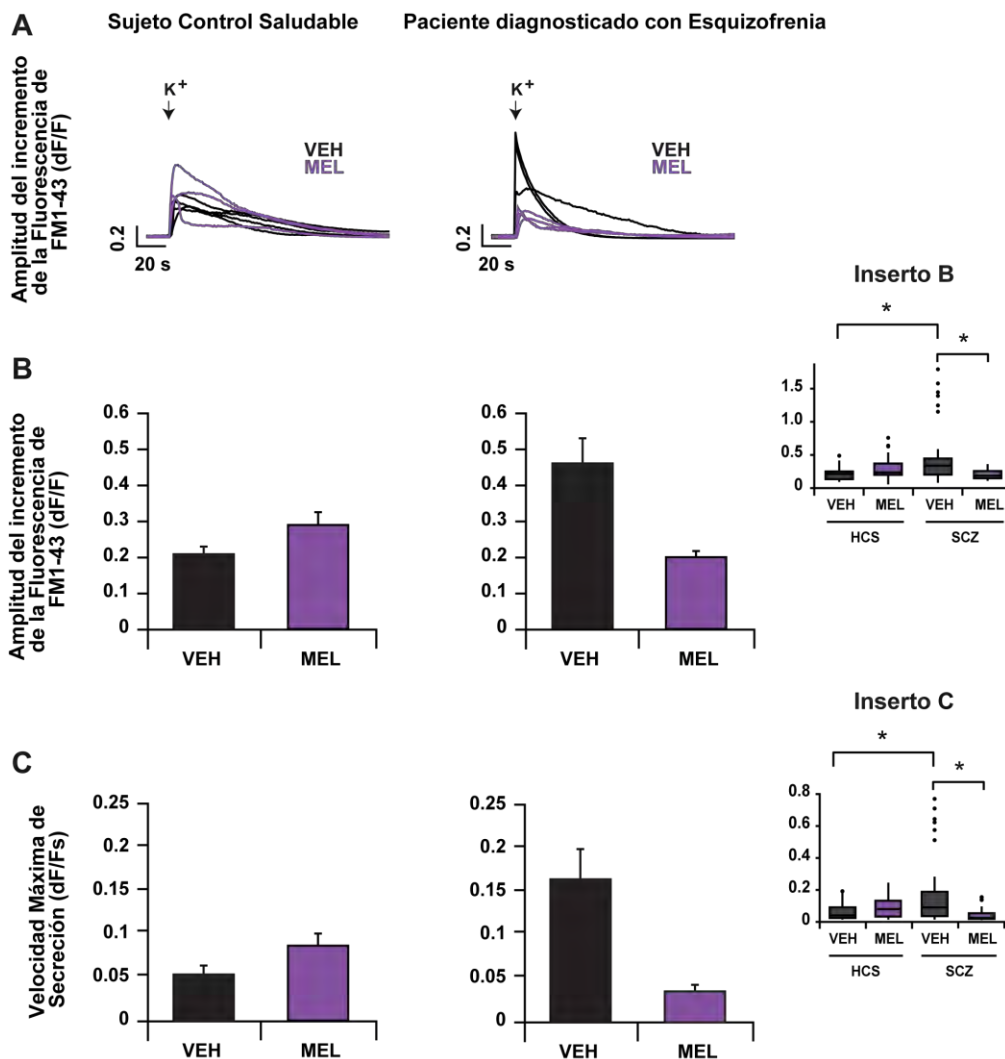


Figura 2. La secreción en los ONPs de SCZ está aumentada y este aumento puede ser regulado por la melatonina. Incrementos en la intensidad de la fluorescencia de FM1-43 en respuesta a la despolarización con alto potasio (K^+), de ONPs obtenidos de un HCS (izquierda) o un paciente diagnosticado con SCZ (derecha), previamente incubados con el vehículo (VEH, negro) o con melatonina (MEL, morado). A) Cinéticas representativas de la fluorescencia de FM1-43 de ONPs. El tiempo de la despolarización se indica con una flecha negra que apunta hacia abajo. El incremento en la fluorescencia refleja exocitosis; B) Amplitud máxima (media + ESM; 27 células de 9 experimentos para cada condición) del incremento en la fluorescencia de FM1-43, expresado como un aumento sobre la fluorescencia basal (dF/F); C) Velocidad de secreción máxima (media + ESM; n 27 células de 9 experimentos para cada condición), obtenida a partir del máximo de la primera derivada del incremento de la fluorescencia. Los insertos en los paneles B y C muestran diagramas de caja de los datos correspondientes. El análisis estadístico se realizó utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) en rangos, seguido de una prueba *post hoc* de Dunn con ajuste de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0.05$).

Evaluación del grosor de los microfilamentos de actina en ONPs derivados de HCS y SCZ.

Dado que el transporte vesicular es mediado por el citoesqueleto, es posible que la desregulación que ocurre en la secreción en los ONPs derivados del paciente con SCZ esté relacionada con alteraciones en el citoesqueleto, que modifiquen la movilización de las vesículas hacia la membrana plasmática y su posterior fusión. La organización del citoesqueleto de actina está modulada por diversos factores de crecimiento y hormonas. Entre estos, la melatonina, provoca reordenamientos del citoesqueleto de actina implicados en la neuritogénesis temprana (Bellon et al., 2007; Benítez-King, 2006). Por ello evaluamos primero el grosor de los microfilamentos de actina en los ONPs derivados del paciente diagnosticado con SCZ y lo comparamos con el de los ONPs derivados de HCS, y posteriormente, dado que la melatonina regula la secreción en los ONPs, evaluamos el efecto de la melatonina sobre el grosor de los microfilamentos de actina para cada uno de los grupos.

El citoesqueleto de actina se caracterizó por medio de la tinción con faloidina acoplada a rodamina (TRITC) en los ONPs derivadas de HCS y del paciente diagnosticado con SCZ, incubados con VEH o con MEL 10^{-5} M. Esta toxina fluorescente se une a la F-actina con una alta afinidad (Dancker et al., 1975). Como se muestra en la Figura 3A, se observaron estructuras filamentosas con marca positiva

para faloidina, que se asemejan a haces de microfilamentos de actina en una disposición paralela tanto en los ONPs derivados de HCS (izquierda) como en los derivados de SCZ (derecha). Se observaron haces de microfilamentos de actina más gruesos en los ONPs tratadas con VEH derivados del paciente con SCZ (Figura 3A, flechas blancas). El análisis morfométrico confirmó que hay microfilamentos significativamente más gruesos en los ONPs derivados del paciente con SCZ en comparación con los derivados de HCS (*p <0,05). Además, nuestros resultados muestran que la melatonina aumentó el grosor de los microfilamentos, tanto en los ONPs derivados del paciente diagnosticado con SCZ como en los derivados de HCS (Figura 3B).

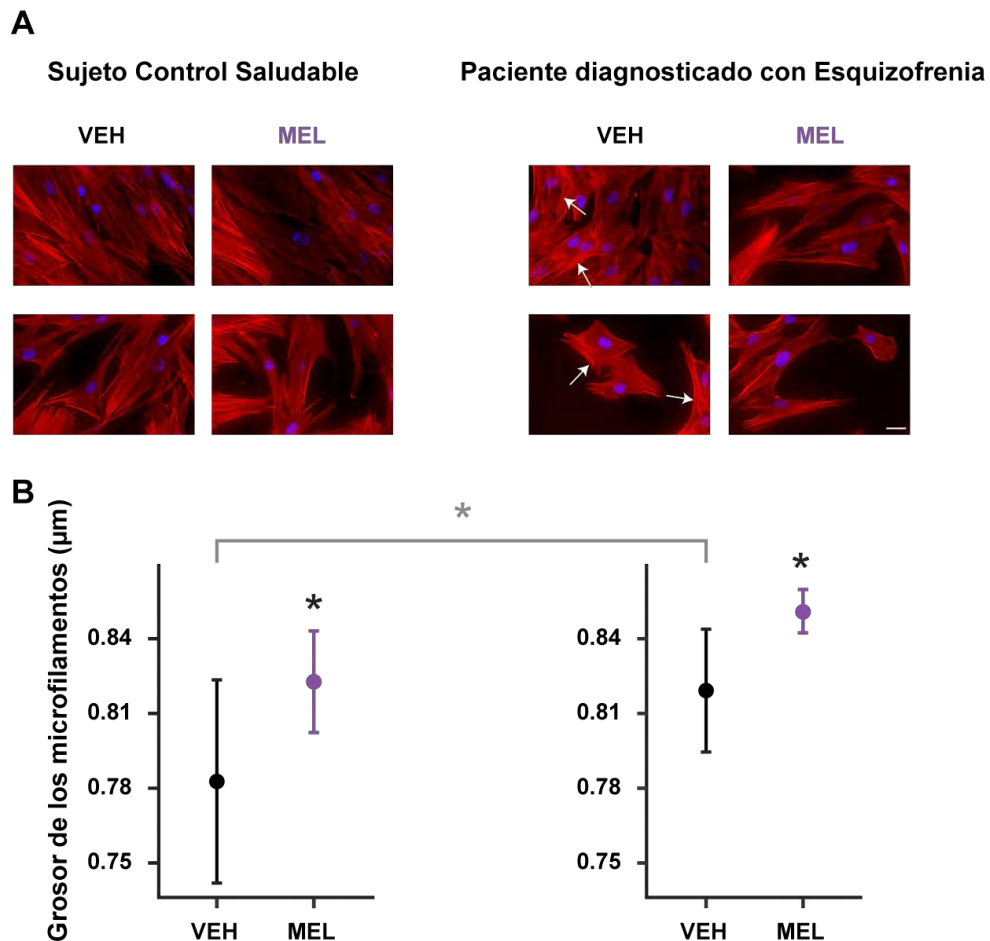


Figura 3. La melatonina aumentó el grosor de los microfilamentos de actina en los ONPs. Los ONPs obtenidos por exfoliación se cultivaron hasta el pasaje 5 y posteriormente se incubaron durante 12 hrs, con el vehículo (VEH) o con melatonina 10^{-5} M (MEL). Las células se fijaron y los microfilamentos se

tiñeron con faloidina acoplada a rodamina (TRITC). A) Imágenes representativas de los ONPs de HCS (izquierda) o derivados de un paciente diagnosticado con SCZ (derecha), que muestran la organización de los microfilamentos de actina. Barra de escala: 10 μm . B) Análisis del grosor de los microfilamentos de actina (85 filamentos por campo; 10 campos para cada condición). Los resultados se expresan como la media \pm DE. Los asteriscos negros indican diferencias significativas (* $p < 0.05$) entre las células incubadas con MEL con respecto a las incubadas únicamente con el VEH, determinadas por una ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Tukey. La diferencia en el grosor de los microfilamentos entre los ONPs derivados de SCZ y de HCS incubados únicamente con el VEH también mostraron diferencias significativas (asterisco gris).

Discusión y Conclusiones.

En este trabajo mostramos por primera vez que los mecanismos de exocitosis están alterados en los precursores neuronales olfatorios de un paciente con esquizofrenia. Evaluamos la secreción inducida por alto K^+ midiendo el aumento en la intensidad de fluorescencia acumulada del colorante lipofílico FM1-43. Este método permite el estudio de la cinética de la exocitosis, que proporciona información sobre los mecanismos que producen y regulan este proceso. La amplitud de la respuesta es una medida indirecta de la cantidad de vesículas que se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido al medio extracelular. La velocidad nos da información sobre la ubicación relativa de las vesículas en reposo y su movilización hacia la membrana plasmática en respuesta a un estímulo. Además, en las neuronas polarizadas, permite la visualización de las estructuras celulares (somas, axones) a partir de las cuales se produce la exocitosis. El curso temporal de la cinética de exocitosis también nos permite distinguir si la secreción ocurre desde sitios sinápticos o extrasinápticos (Trueta and De-Miguel, 2012). En este sentido, hemos descrito previamente que los ONPs de humanos muestran un patrón y un curso temporal de exocitosis que se asemeja al de la secreción extrasináptica que ocurre tanto en el soma como en los axones de las células (Galván-Arrieta et al., 2017). Esto a su vez muestra que en esta preparación también existe un mecanismo de liberación extrasináptica a partir del axón de las células, como el que previamente mostramos en las neuronas de Retzius de la sanguijuela (Cercós et al., en preparación), y de nueva cuenta los resultados sugieren que en los circuitos que forman estas neuronas, la secreción extrasináptica axonal podría también producir efectos paracrinós más locales que los que ocurren a partir de la secreción somática.

El tratamiento con melatonina en los ONPs derivados de SCZ redujo la amplitud y la velocidad de la secreción, llevando a ambos parámetros a niveles similares a los de las células derivadas de los HCS. En un estudio previo, encontramos que el tratamiento con melatonina aumenta la amplitud y la velocidad de la secreción de una clona de ONPs derivada de un sujeto sano (Galván-Arrieta et al., 2017). En los ONPs derivados en cultivo primario del HCS estudiados aquí no encontramos una diferencia significativa en la amplitud ni en la velocidad de la secreción en presencia de melatonina; sin embargo, ambos parámetros mostraron una tendencia a aumentar cuando las células fueron tratadas con la indolamina. Esta aparente inconsistencia podría explicarse por la homogeneidad genética que existe en la clona, lo que proporciona solidez en las respuestas farmacológicas, mientras que las poblaciones celulares más heterogéneas obtenidas en los cultivos primarios aumentan la variabilidad de las respuestas. El efecto diferencial de la melatonina en las células derivadas de SCZ y de HCS, es decir, una reducción o aumento de la secreción, respectivamente, sugiere que la melatonina ejerce una modulación reostática en el proceso de exocitosis en los ONPs. Este tipo de efecto modulador de la melatonina se ha descrito en otros sistemas celulares, como el sistema inmune (Carrillo-Vico et al., 2013). Además se ha mostrado que la melatonina disminuye la liberación de dopamina en la retina, pero no provoca efectos en otras regiones del cerebro, como en el cuerpo estriado (Dubocovich, 1983). Incluso en diferentes regiones de la misma estructura cerebral, como el hipocampo ventral y dorsal, la melatonina tiene efectos diferenciales sobre la secreción de neurotransmisores (Zisapel and Laudon, 1983; Zisapel et al., 1982).

En nuestro estudio anterior, también encontramos que la diferenciación de los ONPs se ve afectada en pacientes con SCZ (Galván-Arrieta et al., 2017). Tal deterioro podría conducir a una conectividad sub-óptima de las neuronas que, en consecuencia, podrían tener una funcionalidad deficiente en términos del establecimiento de circuitos neuronales. El tratamiento con melatonina en estas células indujo la axogénesis de una manera dependiente de la dosis, lo que sugiere fuertemente que la señalización melatonérgica juega un papel clave en la diferenciación morfofuncional de los precursores neuronales. Se ha reportado que los pacientes con SCZ muestran niveles reducidos de melatonina en el suero (Monteleone et al., 1997). En este sentido, es posible inferir que una deficiencia de los niveles de melatonina podría explicar la fisiopatología neuronal, incluyendo los patrones anormales de secreción de neurotransmisores. Curiosamente, nuestros resultados sugieren que algunos de los aspectos del deterioro neurofisiológico relacionado con la SCZ, podrían contrarrestarse por un tratamiento con melatonina. Por lo tanto, sería necesario

realizar estudios clínicos para evaluar el potencial de la melatonina como agente terapéutico en pacientes diagnosticados con SCZ, tal vez en combinación con los tratamientos antipsicóticos actuales. Además, dado que la SCZ puede tener su etiología en el neurodesarrollo, un suplemento apropiado de melatonina a las madres durante el embarazo podría ser útil para la prevención del deterioro de la conectividad neural asociada con la enfermedad.

En términos de los mecanismos celulares que podrían explicar un aumento anormal de la exocitosis en los ONPs de pacientes diagnosticados con SCZ, podrían estar involucrados varios elementos de la vía secretora. Hasta donde sabemos, no se había caracterizado antes la presencia de vesículas secretoras en los ONPs derivados de humanos. Por ello, quisimos analizar la inmunorreactividad en éstas células a VAMP 1/2, para averiguar si la exocitosis alterada en células derivadas de SCZ se correlaciona con cambios en la densidad de las vesículas secretoras. Las proteínas VAMP, también conocidas como sinaptobrevinas, desempeñan un papel clave en la formación de los complejos SNARE que permiten el acoplamiento de las vesículas con la membrana plasmática para su fusión. Además, las proteínas VAMP parecen tener un papel esencial en la exocitosis dependiente de Ca^{2+} (Liu et al., 2011; Schoch et al., 2001). Aunque nuestro análisis no reveló diferencias significativas en la intensidad de inmunofluorescencia de VAMP en los ONPs derivados de SCZ y de HCS o entre las células tratadas con melatonina y vehículo, no podemos descartar cambios sutiles en la expresión de VAMP 1/2 en células derivadas de SCZ. En este sentido la expresión de sinaptobrevinas no se altera en pacientes con SCZ (para revisión ver Egbujo et al., 2016). Sin embargo, como mencionan estos autores, existen pocos estudios que han abordado esta cuestión. En contraste con la intensidad de la inmunofluorescencia de VAMP, que no parece cambiar en células derivadas de SCZ, aquí mostramos que el citoesqueleto de actina muestra diferencias significativas en los ONPs derivados de SCZ. En estas células, encontramos un aumento del grosor de las estructuras filamentosas marcadas con faloidina. Curiosamente, el tratamiento con melatonina produjo un engrosamiento de los haces de microfilamentos de actina tanto en los ONPs derivados de SCZ como en los derivados de HCS. Se ha propuesto que el citoesqueleto de actina puede actuar como un regulador tanto negativo como positivo de la secreción (Porat-Shliom et al., 2013). Por lo tanto, en las células derivadas de SCZ que tienen una secreción anormalmente aumentada, es posible que un ligero engrosamiento de los haces de microfilamentos desempeñe un papel positivo actuando como rieles para dirigir y facilitar el transporte de las vesículas secretoras a los sitios de fusión. Sin embargo, un engrosamiento aun mayor del citoesqueleto de

actina en estas células al tratarlas con melatonina podría formar más bien una barrera física, impidiendo la fusión de la vesículas con la membrana plasmática. Por otro lado, el citoesqueleto de actina también puede actuar como un compartimento de almacenamiento para algunas moléculas que regulan la exocitosis (Sankaranarayanan et al., 2003). Entre estas moléculas, están la GTPasa Cdc42 y el complejo 2/3 (ARP2/3), que están implicados en la remodelación del citoesqueleto de actina y en la exocitosis regulada en células neuroendocrinas (Gasman et al., 2004). La melatonina podría influir en la activación de estas proteínas (Lee et al., 2014); sin embargo, el mecanismo molecular preciso por el cual la melatonina modula los reordenamientos dinámicos del citoesqueleto de actina durante la exocitosis en ONPs aún no se ha estudiado. En conclusión, nuestros hallazgos revelan que los precursores neuronales olfatorios de pacientes con SCZ vivos, que se pueden considerar un modelo *ex-vivo* de la enfermedad, muestran una exocitosis anormalmente aumentada, la cual es llevada a su nivel normal en presencia de melatonina. Los efectos diferenciales en las células derivadas de HCS y de SCZ sugieren que la melatonina es una hormona reostática que restablece el equilibrio en algunos procesos biológicos básicos, entre los cuales se encuentra la secreción de mediadores bioquímicos.

Referencias

Abi-Dargham, A., Gil, R., Krystal, J., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P., Bowers, M., van Dyck, C.H., Charney, D.S., Innis, R.B., and Laruelle, M. (1998). Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. *Am. J. Psychiatry* 155, 761–767.

Alvarez, F.J., Pearson, J.C., Harrington, D., Dewey, D., Torbeck, L., and Fyffe, R.E. (1998). Distribution of 5-hydroxytryptamine-immunoreactive boutons on alpha-motoneurons in the lumbar spinal cord of adult cats. *J. Comp. Neurol.* 393, 69–83.

Arango, V., Underwood, M.D., and Mann, J.J. (2002). Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. *Prog. Brain Res.* 136, 443–453.

Arnold, S.E., and Rioux, L. (2001). Challenges, status, and opportunities for studying developmental neuropathology in adult schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 27, 395–416.

Aunis, D., Hesketh, J.E., and Devilliers, G. (1979). Freeze-fracture study of the chromaffin cell during exocytosis: evidence for connections between the plasma membrane and secretory granules and for movements of plasma membrane-associated particles. *Cell Tissue Res.* 197, 433–441.

Balaban, R.S. (2002). Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 1259–1271.

Baylor, D.A., and Nicholls, J.G. (1971). Patterns of regeneration between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Nature* 232, 268–270.

Bear M, Connors B, Paradiso M. (2001). *Neuroscience: exploring the brain*. 2nd edition.

Beck, A., Lohr C., and Deitmer J.W. (2001). Calcium Transients in Subcompartments of the Leech Retzius Neuron as Induced by Single Action Potentials. *J. Neurobiol.* 48(1), 1-18.

Bellon, A., Ortíz-López, L., Ramírez-Rodríguez, G., Antón-Tay, F., and Benítez-King, G. (2007). Melatonin induces neuritogenesis at early stages in N1E-115 cells through

actin rearrangements via activation of protein kinase C and Rho-associated kinase. *J. Pineal Res.* *42*, 214–221.

Benfenati, F., Bähler, M., Jahn, R., and Greengard, P. (1989). Interactions of synapsin I with small synaptic vesicles: distinct sites in synapsin I bind to vesicle phospholipids and vesicle proteins. *J. Cell Biol.* *108*, 1863–1872.

Benítez-King, G. (2006). Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J. Pineal Res.* *40*, 1–9.

Benítez-King, G., Riquelme, A., Ortíz-López, L., Berlanga, C., Rodríguez-Verdugo, M.S., Romo, F., Calixto, E., Solís-Chagoyán, H., Jiménez, M., Montañó, L.M., et al. (2011). A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *J. Neurosci. Methods* *201*, 35–45.

Bezprozvanny, I., Watras, J., and Ehrlich, B.E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* *351*, 751–754.

Bi, G.Q., Morris, R.L., Liao, G., Alderton, J.M., Scholey, J.M., and Steinhardt, R.A. (1997). Kinesin- and myosin-driven steps of vesicle recruitment for Ca²⁺-regulated exocytosis. *J. Cell Biol.* *138*, 999–1008.

Blackshaw, S.E., Nicholls, J.G., and Parnas, I. (1982). Physiological responses, receptive fields and terminal arborizations of nociceptive cells in the leech. *J. Physiol.* *326*, 251–260.

Breier, A., Su, T.P., Saunders, R., Carson, R.E., Kolachana, B.S., de Bartolomeis, A., Weinberger, D.R., Weisenfeld, N., Malhotra, A.K., Eckelman, W.C., et al. (1997). Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 2569–2574.

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

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

Brown, S.S. (1999). Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 63–80.

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

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

Bunin, M.A., and Wightman, R.M. (1998). Quantitative Evaluation of 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) Neuronal Release and Uptake: An Investigation of Extrasynaptic Transmission. *J Neurosci.* 18(13): 4854-4860.

Bunin, M.A., and Wightman, R.M. (1999). Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of 5-HT. *Trends Neurosci.* 22, 377–382.

Byrne, J.H., Baxter, D.A., Buonomano, D.V., Cleary, L.J., Eskin, A., Goldsmith, J.R., McClendon, E., Nazif, F.A., Noel, F., and Scholz, K.P. (1991). Neural and molecular bases of nonassociative and associative learning in *Aplysia*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 627, 124–149.

Calof, A.L., and Chikaraishi, D.M. (1989). Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro. *Neuron* 3, 115–127.

Calof, A.L., Bonnin, A., Crocker, C., Kawachi, S., Murray, R.C., Shou, J., and Wu, H.-H. (2002). Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. *Microsc. Res. Tech.* 58, 176–188.

Carrillo-Vico, A., Lardone, P.J., Alvarez-Sánchez, N., Rodríguez-Rodríguez, A., and Guerrero, J.M. (2013). Melatonin: buffering the immune system. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 8638–8683.

Catterall, W.A. (1999). Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in

neurotransmitter release. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 144–159.

Cercós, M.G., De-Miguel, F.F., and Trueta, C. (2009). Real-time measurements of synaptic autoinhibition produced by serotonin release in cultured leech neurons. *J. Neurophysiol.* 102, 1075–1085.

Chazal, G., and Ralston, H.J. 3rd (1987). Serotonin-containing structures in the nucleus raphe dorsalis of the cat: an ultrastructural analysis of dendrites, presynaptic dendrites, and axon terminals. *J. Comp. Neurol.* 259, 317–329.

Chen, B.T., and Rice, M.E. (2001). Novel Ca²⁺ dependence and time course of somatodendritic dopamine release: substantia nigra versus striatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 7841–7847.

Chen, G., Gavin, P.F., Luo, G., and Ewing, A.G. (1995). Observation and quantitation of exocytosis from the cell body of a fully developed neuron in *Planorbis corneus*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 7747–7755.

Chi, P., Greengard, P., and Ryan, T.A. (2003). Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. *Neuron* 38, 69–78.

Chiapponi, C., Piras, F., Piras, F., Caltagirone, C., and Spalletta, G. (2016). GABA System in Schizophrenia and Mood Disorders: A Mini Review on Third-Generation Imaging Studies. *Front. Psychiatry* 7, 61.

Chu, A., Sumbilla, C., Inesi, G., Jay, S.D., and Campbell, K.P. (1990). Specific association of calmodulin-dependent protein kinase and related substrates with the junctional sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochemistry (Mosc.)* 29, 5899–5905.

Cooper, R.L., Fernández-de-Miguel, F and Adams, W.B. (1992). Anterograde and retrograde effects of synapse formation on calcium currents and neurite outgrowth in cultured leech neurons. *Proc. R.Soc Lond B* (1992). 249, 217-222.

Dahlström, A., and Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20, 398–399.

Dancker, P., Löw, I., Hasselbach, W., and Wieland, T. (1975). Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. Biophys. Acta* 400, 407–414.

Del Castillo, J., and Katz, B. (1953). Statistical nature of facilitation at a single nerve-muscle junction. *Nature* 171, 1016–1017.

Del Castillo, J., and Katz, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol.* 124, 560–573.

De-Miguel, F.F., and Trueta, C. (2005a). Synaptic and extrasynaptic secretion of serotonin. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 297–312.

De-Miguel, F.F., and Trueta, C. (2005b). Synaptic and extrasynaptic secretion of serotonin. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 297–312.

De-Miguel, F.F., Santamaría-Holek, I., Noguez, P., Bustos, C., Hernández-Lemus, E., and 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, e45454.

Desai, A., and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 83–117.

Descarries, L., and Mechawar, N. (2000). Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog. Brain Res.* 125, 27–47.

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

Dubocovich, M.L. (1983). Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* 306, 782–784.

Egbujo, C.N., Sinclair, D., and Hahn, C.-G. (2016). Dysregulations of Synaptic Vesicle

Trafficking in Schizophrenia. *Curr. Psychiatry Rep.* 18, 77.

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

Eitzen, G. (2003). Actin remodeling to facilitate membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1641, 175–181.

Fierro L., DiPolo R., Llano I. (1998). Intracellular calcium clearance in Purkinje cell somata from rat cerebellar slices. *J Physiol (Lond)* 510:499–512.

Fernández-de-Miguel, F., Cooper, R.L. and Adams, W.B. (1992). Synaptogenesis and calcium current distribution in cultured leech neurons. *Proc. R.Soc Lond B* (1992). 247, 215-221.

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

Fiumara, F., Giovedì, S., Menegon, A., Milanese, C., Merlo, D., Montarolo, P.G., Valtorta, F., Benfenati, F., and Ghirardi, M. (2004). Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase is essential for synapsin-induced enhancement of neurotransmitter release in invertebrate neurons. *J. Cell Sci.* 117, 5145–5154.

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

Freund, T.F., and Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470.

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

Fuenzalida, L.C., Keen, K.L., and Terasawa, E. (2011). Colocalization of FM1-43, Bassoon, and GnRH-1: GnRH-1 release from cell bodies and their neuroprocesses.

Endocrinology 152, 4310–4321.

Fusar-Poli, P., and Meyer-Lindenberg, A. (2013). Striatal presynaptic dopamine in schizophrenia, part II: meta-analysis of [(18)F]/(11)C]-DOPA PET studies. *Schizophr. Bull.* 39, 33–42.

Galván-Arrieta, T., Trueta, C., Cercós, M.G., Valdés-Tovar, M., Alarcón, S., Oikawa, J., Zamudio-Meza, H., and Benítez-King, G. (2017). The role of melatonin in the neurodevelopmental etiology of schizophrenia: A study in human olfactory neuronal precursors. *J. Pineal Res.* 63.

Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Malacombe, M., Way, M., and Bader, M.-F. (2004). Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol. Biol. Cell* 15, 520–531.

Giner, D., Neco, P., Francés, M. del M., López, I., Viniegra, S., and Gutiérrez, L.M. (2005). Real-time dynamics of the F-actin cytoskeleton during secretion from chromaffin cells. *J. Cell Sci.* 118, 2871–2880.

Goodall, A.R., Danks, K., Walker, J.H., Ball, S.G., and Vaughan, P.F. (1997). Occurrence of two types of secretory vesicles in the human neuroblastoma SH-SY5Y. *J. Neurochem.* 68, 1542–1552.

Graziadei, P.P., and Graziadei, G.A. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J. Neurocytol.* 8, 1–18.

Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A.J., and Benfenati, F. (1993a). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259, 780–785.

Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A.J., and Benfenati, F. (1993b). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259, 780–785.

Guerrero A, Singer J. J, and Fay F.S. (1994). Simultaneous Measurement of Ca²⁺ Release and Influx into Smooth Muscle Cells in Response to Caffeine: A Novel Approach for Calculating the Fraction of Current Carried by Calcium. *J.Gen. Physiol.* 104, 395-422.

Gunter, T.E., Yule, D.I., Gunter, K.K., Eliseev, R.A., and Salter, J.D. (2004). Calcium and mitochondria. *FEBS Lett.* 567, 96–102.

Gutiérrez, L.M. (2012). New insights into the role of the cortical cytoskeleton in exocytosis from neuroendocrine cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 295, 109–137.

Hahn, C.-G., Han, L.-Y., Rawson, N.E., Mirza, N., Borgmann-Winter, K., Lenox, R.H., and Arnold, S.E. (2005). In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.* 483, 154–163.

Hansford, R.G. (1994). Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 495–508.

Harris-Warrick, R.M., and Kravitz, E.A. (1984). Cellular mechanisms for modulation of posture by octopamine and serotonin in the lobster. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 4, 1976–1993.

Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E., and Matthews, G. (1994). Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371, 513–515.

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

Henderson, L.P. (1983). The role of 5-hydroxytryptamine as a transmitter between identified leech neurones in culture. *J. Physiol.* 339, 309–324.

Henderson, L.P., Kuffler, D.P., Nicholls, J., and Zhang, R. (1983). Structural and functional analysis of synaptic transmission between identified leech neurones in culture. *J. Physiol.* 340, 347–358.

Heuser, J.E., Reese, T.S., and Landis, D.M. (1974). Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze-fracture. *J. Neurocytol.* 3, 109–131.

Hilfiker, S., Benfenati, F., Doussau, F., Nairn, A.C., Czernik, A.J., Augustine, G.J., and Greengard, P. (2005). Structural domains involved in the regulation of transmitter release by synapsins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 2658–2669.

Hirasawa, H., Puopolo, M., and Raviola, E. (2009). Extrasynaptic release of GABA by retinal dopaminergic neurons. *J. Neurophysiol.* 102, 146–158.

Hook, V., Brennand, K.J., Kim, Y., Toneff, T., Funkelstein, L., Lee, K.C., Ziegler, M., and Gage, F.H. (2014). Human iPSC neurons display activity-dependent neurotransmitter secretion: aberrant catecholamine levels in schizophrenia neurons. *Stem Cell Rep.* 3, 531–538.

Horiuchi, Y., Kano, S.-I., Ishizuka, K., Cascella, N.G., Ishii, S., Talbot, C.C., Jaffe, A.E., Okano, H., Pevsner, J., Colantuoni, C., et al. (2013). Olfactory cells via nasal biopsy reflect the developing brain in gene expression profiles: utility and limitation of the surrogate tissues in research for brain disorders. *Neurosci. Res.* 77, 247–250.

Hosaka, M., Hammer, R.E., and Südhof, T.C. (1999). A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron* 24, 377–387.

Hua, X., Malarkey, E.B., Sunjara, V., Rosenwald, S.E., Li, W.-H., and Parpura, V. (2004). Ca^{2+} -dependent glutamate release involves two classes of endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores in astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 76, 86–97.

Huang, H.-P., Wang, S.-R., Yao, W., Zhang, C., Zhou, Y., Chen, X.-W., Zhang, B., Xiong, W., Wang, L.-Y., Zheng, L.-H., et al. (2007). Long latency of evoked quantal transmitter release from somata of locus coeruleus neurons in rat pontine slices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1401–1406.

Hull, E.M., Lorrain, D.S., Du, J., Matuszewich, L., Lumley, L.A., Putnam, S.K., and Moses, J. (1999). Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behav. Brain Res.* 105, 105–116.

Huttner, W.B., Schiebler, W., Greengard, P., and De Camilli, P. (1983). Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J. Cell Biol.* 96, 1374–1388.

Iasevoli, F., Tomasetti, C., Buonaguro, E.F., and de Bartolomeis, A. (2014). The glutamatergic aspects of schizophrenia molecular pathophysiology: role of the

postsynaptic density, and implications for treatment. *Curr. Neuropharmacol.* 12, 219–238.

Jacobs, B.L., and Azmitia, E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 72, 165–229.

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

Jaffe, E.H., Marty, A., Schulte, A., and Chow, R.H. (1998). Extrasynaptic vesicular transmitter release from the somata of substantia nigra neurons in rat midbrain slices. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 3548–3553.

Jansen, J.K., and Nicholls, J.G. (1972). Regeneration and changes in synaptic connections between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 636–639.

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

Jobe, P.C., Dailey, J.W., and Wernicke, J.F. (1999). A noradrenergic and serotonergic hypothesis of the linkage between epilepsy and affective disorders. *Crit. Rev. Neurobiol.* 13, 317–356.

Joseph, J., Kremen, W.S., Franz, C.E., Glatt, S.J., van de Leemput, J., Chandler, S.D., Tsuang, M.T., and Twamley, E.W. (2017). Predictors of current functioning and functional decline in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 188, 158–164.

Jovanovic, J.N., Benfenati, F., Siow, Y.L., Sihra, T.S., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Greengard, P., and Czernik, A.J. (1996). Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3679–3683.

Kamiya, H., and Zucker, R.S. (1994). Residual Ca²⁺ and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371, 603–606.

Kang, G., and Holz, G.G. (2003). Amplification of exocytosis by Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in INS-1 pancreatic beta cells. *J. Physiol.* 546, 175–189.

Katz, B., and Miledi, R. (1967a). The release of acetylcholine from nerve endings by graded electric pulses. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 167, 23–38.

Katz, B., and Miledi, R. (1967b). The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J. Physiol.* 189, 535–544.

Katz, B., and Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol.* 195, 481–492.

Kaushalya, S.K., Desai, R., Arumugam, S., Ghosh, H., Balaji, J., and Maiti, S. (2008a). Three-photon microscopy shows that somatic release can be a quantitatively significant component of serotonergic neurotransmission in the mammalian brain. *J. Neurosci. Res.* 86, 3469–3480.

Kaushalya, S.K., Nag, S., Ghosh, H., Arumugam, S., and Maiti, S. (2008b). A high-resolution large area serotonin map of a live rat brain section. *Neuroreport* 19, 717–721.

Kiehn, O., Rostrup, E., and Møller, M. (1992). Monoaminergic systems in the brainstem and spinal cord of the turtle *Pseudemys scripta elegans* as revealed by antibodies against serotonin and tyrosine hydroxylase. *J. Comp. Neurol.* 325, 527–547.

Klein, M., Shapiro, E., and Kandel, E.R. (1980). Synaptic plasticity and the modulation of the Ca²⁺ current. *J. Exp. Biol.* 89, 117–157.

Kosofsky, B.E., and Molliver, M.E. (1987). The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synap. N. Y. N* 1, 153–168.

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. *J. Comp. Physiol. [A]* 186, 221–238.

Kuffler, D.P., Nicholls, J., and Drapeau, P. (1987). Transmitter localization and vesicle

turnover at a serotonergic synapse between identified leech neurons in culture. *J. Comp. Neurol.* 256, 516–526.

Lambert, R.C., Dayanithi, G., Moos, F.C., and Richard, P. (1994). A rise in the intracellular Ca²⁺ concentration of isolated rat supraoptic cells in response to oxytocin. *J. Physiol.* 478 (Pt 2), 275–287.

Laruelle, M., Abi-Dargham, A., Gil, R., Kegeles, L., and Innis, R. (1999). Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol. Psychiatry* 46, 56–72.

Lee, S.-J., Jung, Y.H., Oh, S.Y., Yun, S.P., and Han, H.J. (2014). Melatonin enhances the human mesenchymal stem cells motility via melatonin receptor 2 coupling with G_q in skin wound healing. *J. Pineal Res.* 57, 393–407.

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

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

Leon-Pinzon, C., Cercós, M.G., Noguez, P., Trueta, C., and De-Miguel, F.F. (2014). Exocytosis of serotonin from the neuronal soma is sustained by a serotonin and calcium-dependent feedback loop. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 169.

Liu, Y., Sugiura, Y., and Lin, W. (2011). The role of synaptobrevin1/VAMP1 in Ca²⁺-triggered neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J. Physiol.* 589, 1603–1618.

Llinás, R., Steinberg, I.Z., and Walton, K. (1981). Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys. J.* 33, 323–351.

Llinás, R., Sugimori, M., and Silver, R.B. (1992). Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256, 677–679.

Llinás, R., Sugimori, M., and Silver, R.B. (1995). The concept of calcium concentration microdomains in synaptic transmission. *Neuropharmacology* 34, 1443–1451.

Ludwig, M., and Leng, G. (2006). Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 126–136.

Malacombe, M., Bader, M.-F., and Gasman, S. (2006). Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1175–1183.

Mallart, A., and Martin, A.R. (1968). The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *J. Physiol.* 196, 593–604.

Mansvelder, H.D., and Kits, K.S. (2000). Calcium channels and the release of large dense core vesicles from neuroendocrine cells: spatial organization and functional coupling. *Prog. Neurobiol.* 62, 427–441.

Markram H., Helm P.J., Sakmann B. (1995). Dendritic calcium transients evoked by single back-propagating action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol (Lond)* 485:1–20.

Masedunskas, A., Porat-Shliom, N., and Weigert, R. (2012). Linking differences in membrane tension with the requirement for a contractile actomyosin scaffold during exocytosis in salivary glands. *Commun. Integr. Biol.* 5, 84–87.

McCall, R.B., and Aghajanian, G.K. (1979). Serotonergic facilitation of facial motoneuron excitation. *Brain Res.* 169, 11–27.

McCurdy, R.D., Féron, F., McGrath, J.J., and Mackay-Sim, A. (2005). Regulation of adult olfactory neurogenesis by insulin-like growth factor-I. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1581–1588.

Meissner, G. (1986). Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 261, 6300–6306.

Miledi, R., and Parker, I. (1981). Calcium transients recorded with arsenazo III in the presynaptic terminal of the squid giant synapse. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain.*

Pap. Biol. Character R. Soc. G. B. 212, 197–211.

Monteleone, P., Natale, M., La Rocca, A., and Maj, M. (1997). Decreased nocturnal secretion of melatonin in drug-free schizophrenics: no change after subchronic treatment with antipsychotics. *Neuropsychobiology* 36, 159–163.

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

Muallem, S., Kwiatkowska, K., Xu, X., and Yin, H.L. (1995). Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J. Cell Biol.* 128, 589–598.

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

Nakata, T., and Hirokawa, N. (1992). Organization of cortical cytoskeleton of cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deep-etching, and double-label immunoelectron microscopy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 2186–2197.

Neher, E., and Augustine, G.J. (1992). Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 450, 273–301.

Neumann, I., Douglas, A.J., Pittman, Q.J., Russell, J.A., and Landgraf, R. (1996). Oxytocin released within the supraoptic nucleus of the rat brain by positive feedback action is involved in parturition-related events. *J. Neuroendocrinol.* 8, 227–233.

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

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

Nightingale, T.D., Cutler, D.F., and Cramer, L.P. (2012). Actin coats and rings promote regulated exocytosis. *Trends Cell Biol.* 22, 329–337.

Oheim, M., and Stühmer, W. (2000). Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur. Biophys. J. EBJ* 29, 67–89.

Patel, J.C., Witkovsky, P., Avshalumov, M.V., and Rice, M.E. (2009). Mobilization of calcium from intracellular stores facilitates somatodendritic dopamine release. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 6568–6579.

Payton, B. (1981). Structure of the leech nervous system. En: Muller, K.J., Nicholls, J.G. y Stent, G.S. (eds). *Neurobiology of the leech*. Cold Spring Harbor Publications. Cold Spring Harbor, New York. p. 35-50.

Pessah, I.N., Francini, A.O., Scales, D.J., Waterhouse, A.L., and Casida, J.E. (1986). Calcium-ryanodine receptor complex. Solubilization and partial characterization from skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.* 261, 8643–8648.

Pieribone, V.A., Shupliakov, O., Brodin, L., Hilfiker-Rothenfluh, S., Czernik, A.J., and Greengard, P. (1995). Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature* 375, 493–497.

Plattner, H., Artalejo, A.R., and Neher, E. (1997). Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J. Cell Biol.* 139, 1709–1717.

Pollard, T.D., Selden, S.C., and Maupin, P. (1984). Interaction of actin filaments with microtubules. *J. Cell Biol.* 99, 33s – 37s.

Porat-Shliom, N., Milberg, O., Masedunskas, A., and Weigert, R. (2013). Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 2099–2121.

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

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

Rački, V., Petrić, D., Kučić, N., Gržeta, N., Jurdana, K., and Rončević-Gržeta, I. (2016). Cortical gray matter loss in schizophrenia: Could microglia be the culprit? *Med. Hypotheses* 88, 18–21.

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

Reuter, H. (1996). Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 331–337.

Ridet, J.L., Rajaofetra, N., Teilhac, J.R., Geffard, M., and Privat, A. (1993). Evidence for nonsynaptic serotonergic and noradrenergic innervation of the rat dorsal horn and possible involvement of neuron-glia interactions. *Neuroscience* 52, 143–157.

Rosé, S.D., Lejen, T., Casaletti, L., Larson, R.E., Pene, T.D., and Trifaró, J.-M. (2002). Molecular motors involved in chromaffin cell secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 971, 222–231.

Ross, W.N., Arechiga, H., and Nicholls, J.G. (1987). Optical recording of calcium and voltage transients following impulses in cell bodies and processes of identified leech neurons in culture. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 7, 3877–3887.

Sahley, C.L. (1994). Serotonin depletion impairs but does not eliminate classical conditioning in the leech *Hirudo medicinalis*. *Behav. Neurosci.* 108, 1043–1052.

Sakurada, K., Kato, H., Nagumo, H., Hiraoka, H., Furuya, K., Ikuhara, T., Yamakita, Y., Fukunaga, K., Miyamoto, E., Matsumura, F., et al. (2002). Synapsin I is phosphorylated at Ser603 by p21-activated kinases (PAKs) in vitro and in PC12 cells stimulated with bradykinin. *J. Biol. Chem.* 277, 45473–45479.

Saller, C.F., and Stricker, E.M. (1976). Hyperphagia and increased growth in rats after intraventricular injection of 5,7-dihydroxytryptamine. *Science* 192, 385–387.

Sánchez, C., Díaz-Nido, J., and Avila, J. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog. Neurobiol.* 61, 133–168.

Sandler VM., and Barbara JG. (1999). Calcium-induced calcium release contributes to action potential-evoked calcium transients in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 19:4325–4336.

Sankaranarayanan, S., Atluri, P.P., and Ryan, T.A. (2003). Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nat. Neurosci.* 6, 127–135.

Sarkar, B., Das, A.K., Arumugam, S., Kaushalya, S.K., Bandyopadhyay, A., Balaji, J., and Maiti, S. (2012). The dynamics of somatic exocytosis in monoaminergic neurons. *Front. Physiol.* 3, 414.

Satrústegui, J., Pardo, B., and Del Arco, A. (2007). Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* 87, 29–67.

Schiebler, W., Jahn, R., Doucet, J.P., Rothlein, J., and Greengard, P. (1986). Characterization of synapsin I binding to small synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 261, 8383–8390.

Schoch, S., Deák, F., Königstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Südhof, T.C., and Kavalali, E.T. (2001). SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* 294, 1117–1122.

Sheng, Z.H., Westenbroek, R.E., and Catterall, W.A. (1998). Physical link and functional coupling of presynaptic calcium channels and the synaptic vesicle docking/fusion machinery. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 335–345.

Sihra, T.S., Wang, J.K., Gorelick, F.S., and Greengard, P. (1989). Translocation of synapsin I in response to depolarization of isolated nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 8108–8112.

Sokac, A.M., and Bement, W.M. (2006). Kiss-and-coat and compartment mixing: coupling exocytosis to signal generation and local actin assembly. *Mol. Biol. Cell* 17,

1495–1502.

Soldo, B.L., Giovannucci, D.R., Stuenkel, E.L., and Moises, H.C. (2004). Ca²⁺ and frequency dependence of exocytosis in isolated somata of magnocellular supraoptic neurones of the rat hypothalamus. *J. Physiol.* *555*, 699–711.

Stewart, R.R., Adams, W.B., and Nicholls, J.G. (1989). Presynaptic calcium currents and facilitation of serotonin release at synapses between cultured leech neurones. *J. Exp. Biol.* *144*, 1–12.

Sun, Y.A., and Poo, M.M. (1987). Evoked release of acetylcholine from the growing embryonic neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 2540–2544.

Trueta, C., and De-Miguel, F.F. (2012). Extrasynaptic exocytosis and its mechanisms: a source of molecules mediating volume transmission in the nervous system. *Front. Physiol.* *3*.

Trueta, C., Méndez, B., and De-Miguel, F.F. (2003). Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurones. *J. Physiol.* *547*, 405–416.

Trueta, C., Sánchez-Armass, S., Morales, M.A., and De-Miguel, F.F. (2004). Calcium-induced calcium release contributes to somatic secretion of serotonin in leech Retzius neurons. *J. Neurobiol.* *61*, 309–316.

Trueta, C., Kuffler, D.P., and De-Miguel, F.F. (2012). Cycling of dense core vesicles involved in somatic exocytosis of serotonin by leech neurons. *Front. Physiol.* *3*, 175.

Turetsky, B.I., Hahn, C.-G., Arnold, S.E., and Moberg, P.J. (2009). Olfactory receptor neuron dysfunction in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *34*, 767–774.

Ueda, T., and Greengard, P. (1977). Adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein system of neuronal membranes. I. Solubilization, purification, and some properties of an endogenous phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* *252*, 5155–5163.

Van Bockstaele, E.J., and Pickel, V.M. (1993). Ultrastructure of serotonin-

immunoreactive terminals in the core and shell of the rat nucleus accumbens: cellular substrates for interactions with catecholamine afferents. *J. Comp. Neurol.* 334, 603–617.

Varga, V., Losonczy, A., Zemelman, B.V., Borhegyi, Z., Nyiri, G., Domonkos, A., Hangya, B., Holderith, N., Magee, J.C., and Freund, T.F. (2009). Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits. *Science* 326, 449–453.

Visscher, K., Schnitzer, M.J., and Block, S.M. (1999). Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature* 400, 184–189.

van Weering, J.R.T., Wijntjes, R., de Wit, H., Wortel, J., Cornelisse, L.N., Veldkamp, W.J.H., and Verhage, M. (2008). Automated analysis of secretory vesicle distribution at the ultrastructural level. *J. Neurosci. Methods* 173, 83–90.

Weiger, W.A. (1997). Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 72, 61–95.

Welch, M.D., and Mullins, R.D. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 247–288.

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

Willard A.L. (1981). Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech. *J Neurosci.* 1(9), 936–944.

Woo, T.-U.W. (2014). Neurobiology of schizophrenia onset. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 16, 267–295.

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

Zhang, X., Klueber, K.M., Guo, Z., Lu, C., and Roisen, F.J. (2004). Adult human

olfactory neural progenitors cultured in defined medium. *Exp. Neurol.* 186, 112–123.

Zhang, X., Klueber, K.M., Guo, Z., Cai, J., Lu, C., Winstead, W.I., Qiu, M., and Roisen, F.J. (2006). Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors. *Brain Res.* 1073-1074, 109–119.

Zhang, X., Chen, Y., Wang, C., and Huang, L.-Y.M. (2007). Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9864–9869.

Zisapel, N., and Laudon, M. (1983). Inhibition by melatonin of dopamine release from rat hypothalamus: regulation of calcium entry. *Brain Res.* 272, 378–381.

Zisapel, N., Egozi, Y., and Laudon, M. (1982). Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain Res.* 246, 161–163.