



Exocitosis

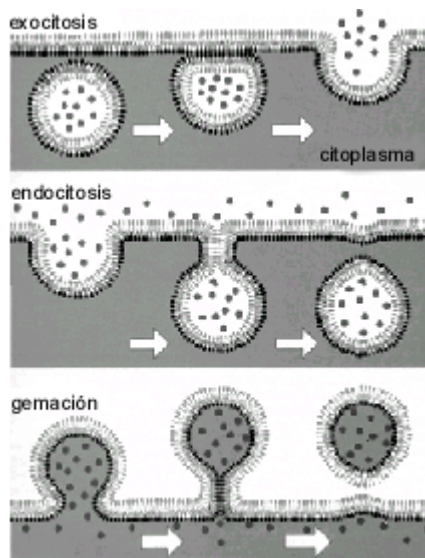
Erica Jaffé ¹.

¹Neuroquímica

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina -
Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia
Biomédica Digital.

INTRODUCCIÓN



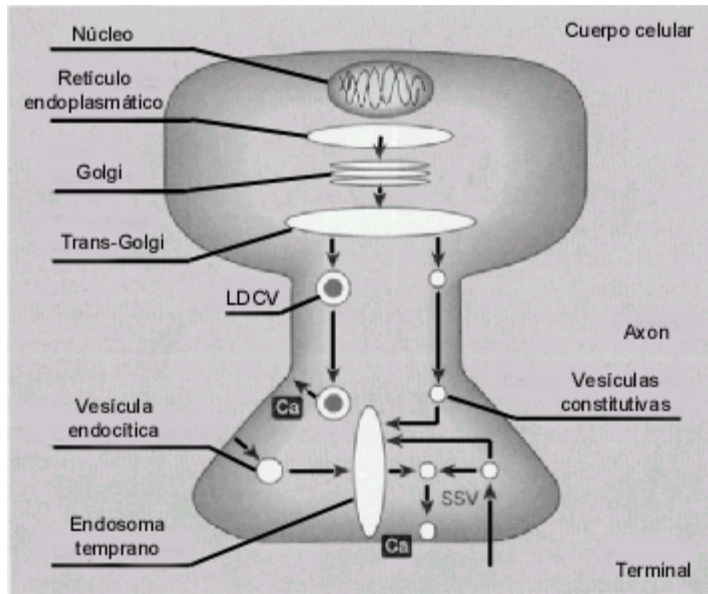
La exocitosis es el proceso mediante el cual se secretan diferentes tipos de moléculas contenidas en una vesícula citoplasmática de una célula al espacio extracelular, expresándose en todas las células eucariotas. La exocitosis implica la fusión de la membrana vesicular a la membrana plasmática, de manera calcio dependiente. La exocitosis se ha especializado grandemente en células secretoras y neuronas, es altamente regulable y se denomina **exocitosis regulada**. Posterior a la exocitosis la vesícula es recuperada por el mecanismo de endocitosis que también se ha especializado y es regulable en cierto tipo de células. La gemación de vesículas nuevas de diferentes compartimentos de la célula como el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático también es un proceso constitutivo expresado en todas las

células.

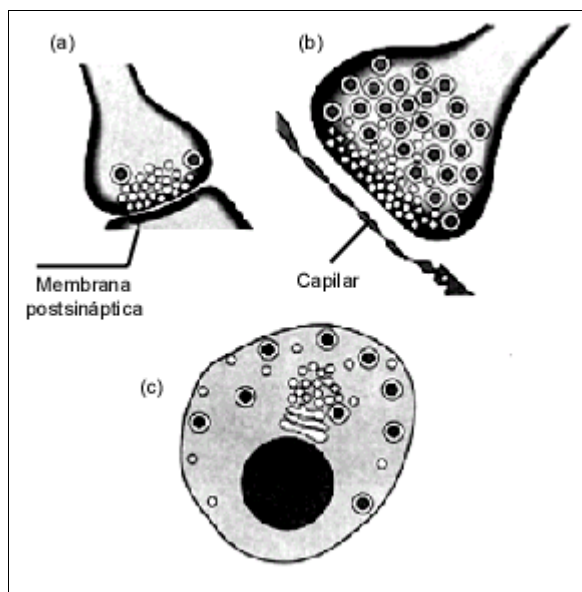
Hay que diferenciar la exocitosis regulada de la **exocitosis constitutiva** por la cual las células transportan elementos de membrana y proteínas continuamente a la membrana plasmática. Sin embargo hay muchos pasos en los cuales estos dos mecanismos se asemejan.

Origen de las vesículas constitutiva y reguladas. Ambos tipos de vesículas comparten los mismos pasos desde su formación a nivel del retículo endoplasmático y diferentes compartimentos del aparato de Golgi a nivel del cuerpo celular. Posteriormente son

transportadas a los terminales donde se fusionan con compartimentos específicos del retículo o a la membrana plasmática. Las vesículas reguladas se incorporan a compartimentos específicos de zonas activas (sinapsis en caso de la neurona) para ser liberadas por estímulos específicos. Las vesículas reguladas se pueden clasificar según su tamaño y contenido en vesículas **sinápticas pequeñas (SSV)** y **vesículas grandes, densas (LDCV)**. Las vesículas SSV pueden ser recicladas en el endosoma temprano a nivel del terminal lo que hace mas rápida y prolongada la capacidad de formación y utilización de este tipo de vesículas.

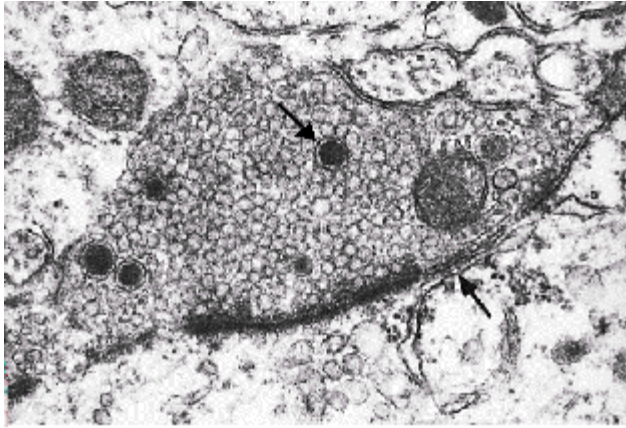


Las vesículas LDCV no son acumuladas a nivel de las zonas activas y tienen un reciclaje más lento que se realiza a nivel del aparato de Golgi en el cuerpo celular. Las proteínas intravesiculares, también se sintetizan y almacenan en el aparato de Golgi y retículo endoplasmático del cuerpo celular. Las vesículas claras o SSV y las vesículas densas o LDCV se pueden encontrar en diversas estructuras y frecuentemente coexisten estos dos tipos de vesículas.



Así en a) se representa un terminal presináptico del tipo de las catecolaminas con vesículas

SSV y LDCV. En b) se representa un terminal de la neurohipófisis en la cual sólo hay secreción de péptidos pero también allí se ven ambos tipos de vesículas . En c) se esquematiza una célula endocrina como las células cromafines, en las cuales también se ven ambas vesículas sin estar asociadas a especializaciones sinápticas. En estas células las vesículas no se denominan SSV ya que no están asociadas a sinapsis y tienen diferencias en la composición de sus proteínas .



Terminal nervioso con vesículas pequeñas sinápticas y algunas vesículas grandes y densas

A nivel del terminal nervioso se pueden observar las vesículas claras SSV de aproximadamente 50 nm, adyacentes y ancladas a las especializaciones de una sinapsis química y LDCV de 100 nm.

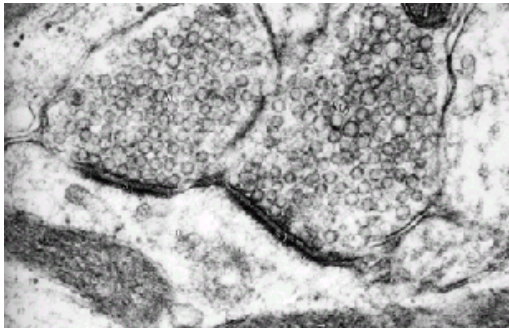
Estas especializaciones sinápticas están compuestas por diversas proteínas. Múltiples estudios han establecido la composición de estas dos vesículas SSV y LDCV, las cuales presentan una distribución diferencial. Así en la siguiente tabla se muestran algunas de estas diferencias en las vesículas noradrenérgicas.

	Vesículas pequeñas tipo SSV	Vesículas densas tipo LDC
Componentes solubles		
Noradrenalina	Presente	Presente
ATP	Presente	Presente
Cromograninas	Ausente	Presente
Neuropéptidos	Ausente	Presente
Proteínas asociadas a membrana vesicular		
Dopamina- β -hidroxilasa	Presente	Presente
Sinapsina	Presente	Ausente
Proteínas de la membrana vesicular		
Sinaptotagmina	Presente	Presente
Sinaptobrevina	Presente	Ausente
Sinaptofisina	Presente	Ausente

Las SSV se ha asociado con los neurotransmisores rápidos, tipo aminoácidos (GABA,

glutamato etc.) y acetilcolina. Las vesícula LDCV se asocian con transmisores peptídicos.

SINAPSIS



La **sinapsis** es la estructura responsable de la transmisión química entre dos células a nivel del sistema nervioso que ocurre por el mecanismo de exocitosis . En la micrografía electrónica se puede observar un terminal nervioso con los elementos presinápticos y postsinápticos. Así se pueden apreciar las vesículas presinápticas SSV, densidades presinápticas y una densidad postsináptica divididas

por un espacio sináptico de 15 a 100 nm. Las estructuras densas están dadas por la presencia de diversas proteínas sinápticas. Ya se han caracterizado múltiples proteínas asociadas con el proceso de exocitosis y que se pueden diferenciar según el tipo de vesícula (ver arriba) y también tipos celulares.

Las proteínas involucradas de una manera más universal en el proceso de exocitosis son las siguientes:

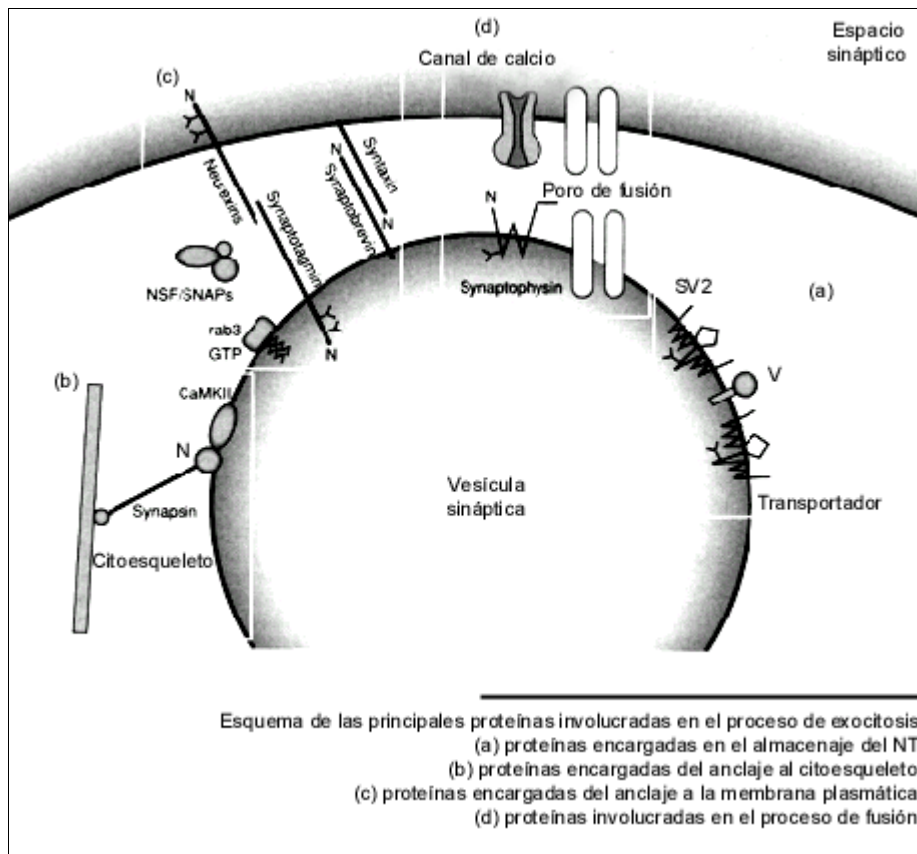
Proteínas de la membrana vesicular

Bomba de protones vacuolar

Es una ATPasa que al generar un gradiente electroquímico de protones genera la energía para la captura de los neurotransmisores (NTs). Componente mayoritario de las SSV.

Transportador de neurotransmisores

Proteínas con 12 dominios transmembrana. Varía según el tipo de NT clásico, no existe para NTs peptídicos.



Se encarga de la recaptura del NT a nivel del terminal. Almacena al NT en altas concentraciones y puede llegar a 0.6 M, como en el caso de la acetilcolina.

SV2 Proteína altamente glicosilada. Presenta homología con proteínas transportadoras de bacterias y eucariotes. Posible función de transporte de Cl^- . Recientemente se ha encontrado que se une a sinaptotagmina.

Sinapsina Varios isoformas, se considera una ATPasa específica de neuronas. Fundamental para la unión de las SSV a proteínas del citoesqueleto como la actina. Tiene sitios de regulación por fosforilación para una kinasa de la Ca-calmodulina. Mantiene a las vesículas SSV en un **almacén de reserva**, listo para liberación, cerca de la zona activa de la sinapsis.

Proteinkinasa I y II dependientes de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKI y II). Fosforiliza la sinapsina y regula negativamente la unión de las SSV a la actina. Se encuentra asociada a la membrana vesicular y citoplasmática.

Sinaptotagminas Proteína con al menos 8 isoformas, presente en células eucarióticas superiores. Fundamental para el anclaje y posiblemente para la fusión de las vesículas a zonas activas de la membrana plasmática, por su unión con proteínas específicas de la membrana como la syntaxina y neurexinas. Puede formar parte del complejo de v-SNARE (receptores del complejo proteico SNAP) en vesículas sinápticas. Presenta 2 dominios de unión para Ca^{++} con una afinidad de 10 μM .

Sinaptobrevinas (VAMP) Proteínas cortas fundamental para el anclaje y posible fusión de las vesículas al unirse a proteínas específicas de la membrana plasmática como la syntaxina y la

SNAP25, todas ellas son altamente conservadas desde levaduras hasta mamíferos. Son reguladas por Ca^{++} . Estas proteínas forman parte de las denominadas proteínas v-SNARE. Son disociadas por las **toxinas botulínica y tetánica**.

Rab3 Son proteínas muy conservadas en la escala evolutiva desde las levaduras hasta los mamíferos. Es una GTPasa de peso molecular bajo regulada por GTP. Modulan el anclaje y posible activación de las vesículas a las zonas activas y la regulación de las proteínas SNARE. Se recicla de la membrana vesicular al citoplasma.

Sinaptofisinas Posible componente del poro de fusión. Se une a sinaptobrevina. Se encuentra altamente concentrada en vesículas SSV y muy poco en las LDCV. Se regula por fosforilación por PKII dependiente de Ca-calmodulina.

Proteínas solubles asociadas a la membrana plasmática

Factor sensible a N-etilmaleimide (NSF) Es una ATPasa fundamental para direccionar el tráfico de membranas en todas las células eucariotas a diferentes niveles. De manera parecida se aislaron las Proteínas soluble unida a NSF (SNAP). Estas proteínas deben unirse para activar el proceso de dirección y anclaje de las vesículas además de otras proteínas específicas como las **SNARE**, los receptores del complejo proteico SNAP. En el terminal nervioso el complejo SNARE está formado por syntaxina, SNAP25 y sinaptobrevina. Diferentes **toxinas botulínicas** son capaces de disociar estas proteínas.

Sec6/8 Complejo de 8 proteínas , homólogo a complejos proteicos de las levaduras. Fundamentales en todos las células para el proceso de direccionar el tráfico de proteínas y vesículas. Se encuentra soluble y ligado a las membranas plasmáticas. Se une a la syntaxina y a la profilina del citoesqueleto

Munc18 Proteínas fundamentales en el proceso de anclaje de las vesículas se unen a las syntaxinas.

Proteínas de la zona activa de la membrana plasmática

Neurexinas Existen más de 1000 isoformas de esta familia. Se encuentran a nivel del terminal nervioso y tienen funciones de reconocimiento celular y de tráfico de membranas y facilitan el anclaje específico.

Syntaxinas Ampliamente distribuidas. Tienen función en el anclaje de las vesículas al unirse con sinaptotagmina, sinaptobrevina , SNAP25, Sec6/8 y canales de Ca^{++} . Hidrolizadas por la **toxina botulínica**.

Canales de Ca^{++} voltaje sensibles Se ha demostrado la presencia de canales de Ca^{++} a nivel de las zonas activas de una sinapsis. Se han descrito diferentes tipos de canales de Ca^{++} asociados a la sinapsis (N,L,P/Q).

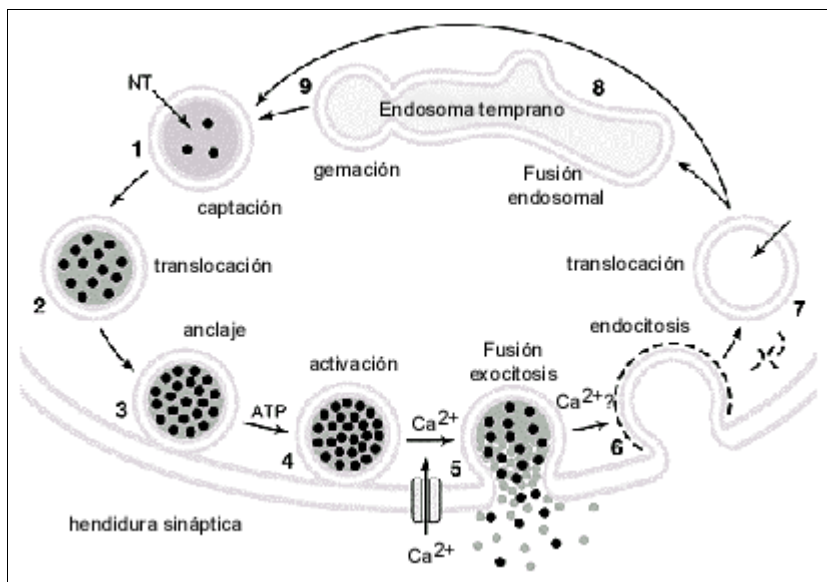
t-SNARE Son diversas proteínas de la membrana plasmática que actúan como receptores específicos para las proteínas homólogas de las vesículas como son la sinaptobrevina y la sinaptotagmina. Este tipo de proteínas se han encontrado también para dirigir el tráfico de

membranas a nivel del aparato de Golgi y están altamente conservadas desde levaduras hasta los mamíferos. Se consideran elementos fundamentales en el proceso de anclaje y fusión de las vesículas.

MECANISMO DE EXOCITOSIS

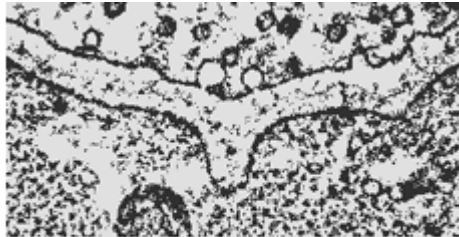
Aspecto molecular

El proceso de secreción, específicamente exocitosis, involucra varias etapas. Nosotros analizaremos con más detalle este mecanismo a nivel de un terminal nervioso donde ya hemos descrito los diferentes elementos involucrados como son las vesículas, las diversas proteínas, los canales de Ca^{++} , etc.



Así, una vez formada la vesícula sináptica a partir del endosoma temprano (**1**) para vesículas pequeñas, y/o a partir del transporte axonal rápido para las vesículas densas, se localizan en sitios cerca de las zonas activas denominados "**compartimento de reserva**". Allí se mantienen gracias a la interacción con la actina, porfilina u otros elementos del citoesqueleto con proteínas específicas de la membrana vesicular fundamentalmente la sinapsina y las NSF y SNAP (ver arriba). Paralelo al proceso de síntesis, transporte direccional y almacenaje de las vesículas, se realiza la síntesis de las sustancias NTs. Así los NTs clásicos como también los peptidérgicos van a ser sintetizados en el aparato de Golgi, a nivel de el cuerpo neuronal y son transportadas en vesículas a sus sitios de almacenaje. Los NTs clásicos, también van a ser sintetizados a nivel del terminal. Allí, las vesículas se van a recargar con el NT a través de los transportadores específicos. Esta captura activa del NT está dada por el gradiente electroquímico establecido por la bomba de protones vesicular. Las vesículas ya cargadas y fijadas al citoesqueleto se consideran en el "**compartimento de reserva**". De este compartimento las vesículas van a ser dirigidas y ancladas específicamente por la interacción de ciertas proteínas a los sitios activos de la membrana plasmática (**2-3**) para este paso se considera fundamental el complejo proteico Sec6/8, munc18, sinaptobrevina, SNAP25,

sintaxina forman el complejo SNAREv vesicular y se unen a los elementos SNAREt plasmáticos. Este almacén de vesículas se denomina el **compartimento listo para librar** (RRP: ready-releasable-pool). Una vez ancladas las vesículas van a ser activadas **(4)** a través de la activación de la sinaptotagmina y unión a la sintaxina. Este proceso requiere de Ca^{++} . Además están involucradas otras proteínas como las Rabs que se unen reversiblemente al complejo SNARE y requiere GTP. Las Rabs también se han descrito involucradas en el anclaje de las vesículas.

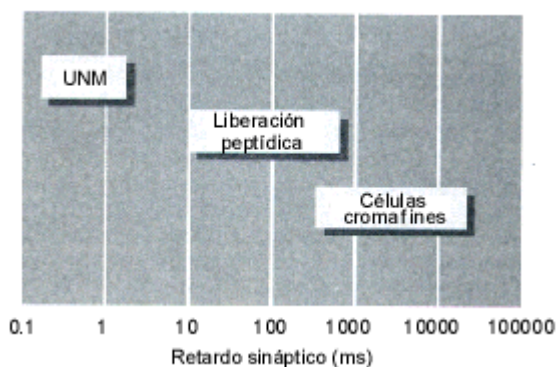


Micrografía electrónica de un terminal de una unión neuromuscular en la cual se puede observar vesículas en diferentes etapas del ciclo vesicular

Todavía existe controversia en la exacta secuencia de la cascada de activación de las diversas proteínas involucradas en la exocitosis, como igualmente sobre cuáles proteínas son las responsables del proceso constitutivo de exocitosis y cuáles en el regulado.

El paso de la fusión de la vesícula **(5)** todavía no está bien establecido. Se considera que al formarse el complejo SNARE y luego por la hidrólisis de ATP por NSF se disocia el complejo y es capaz por tensión superficial lograr la fusión de los lípidos de la membrana vesicular con la plasmática. En este paso se considera que la presencia de canales de Ca^{++} y su activación es fundamental. Así la sinaptotagmina activada por el Ca^{++} dimeriza el complejo SNARE, y lo concentra en la zona activa y así aumenta la probabilidad de fusión, se hace más reproducible y rápida ya que se ha visto que la formación del complejo SNARE por sí solo, no es suficiente para inducir la fusión. Los canales de Ca^{++} tipo N y P/Q se unen a la sintaxina, un componente de los SNAREt garantizando la entrada rápida y en altas concentraciones del Ca^{++} necesario para inducir la liberación de NTs de acción rápida. También se ha descrito un mecanismo dependiente de la Ca^{++} -calmodulina necesario para la fase final de la exocitosis. Una vez que la vesícula se fusiona a la membrana plasmática, es recuperada por el proceso de endocitosis **(6)** que también requiere de varios pasos y depende de la formación de clatrina entre otros, para su activación.

ASPECTOS FUNIONALES



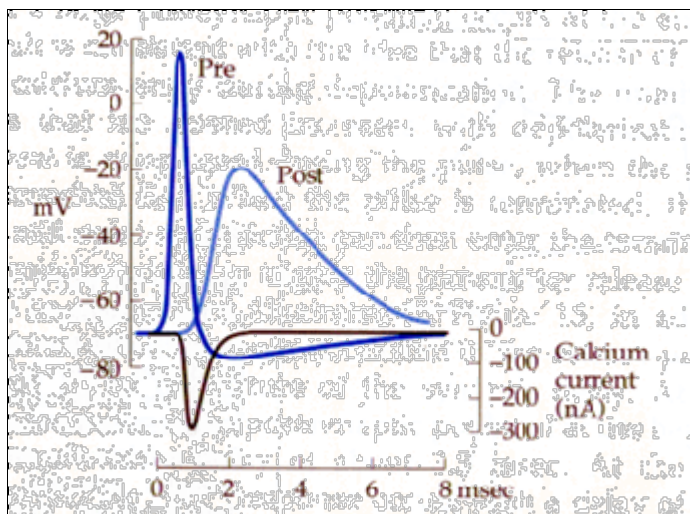
El proceso de exocitosis es un mecanismo fisiológico muy dinámico que según el tipo de vesículas o tipo celular tiene características especiales. Así la respuesta a un estímulo tiene un retardo en la respuesta exocitótica de fracciones de mseg para el caso de la liberación de la acetilcolina en la unión neuromuscular (UNM).

A nivel de un terminal nervioso el retardo sináptico es de 10 mseg para sinapsis de NT rápidos tipo GABA y glutamato y de más de 100 mseg para las sinapsis lentas tipo noradrenalina o péptidos. En las células secretoras como las

células cromafines o los mastocitos el proceso de exocitosis puede tener un retardo de varios segundos hasta minutos. Esta variación en tiempo de exocitosis significa un acople de la maquinaria exocitótica diferente y una participación de distintos elementos moleculares. Esto vuelve a indicarnos que sobre un mecanismo básico, igual a la exocitosis constitutiva, existen mecanismos regulados y especializados para los diferentes tipos de células.

Existen técnicas de microscopía electrónica y de microscopía de luz de gran potencia por las cuales se pueden visualizar las vesículas sinápticas en sus diversos estadios y su relación con los otros elementos de la membrana celular y la sinapsis. Un enfoque de gran valor para el estudio funcional de la sinapsis ha sido por las técnicas electrofisiológicas y ópticas con marcadores fluorescentes. Estas son técnicas rápidas y localizadas para estudiar el proceso de exocitosis. El problema más grande de estas técnicas ha sido poder diferenciar entre los elementos postsinápticos y presinápticos es decir si estamos midiendo un cambio en la velocidad de liberación a nivel presináptico o un cambio en la eficiencia de los receptores postsinápticos. Otro enfoque de gran utilidad en resolver preguntas a este nivel han sido las técnicas bioquímicas. Estas han servido para caracterizar los diferentes elementos moleculares, como también estudiar la liberación de los NTS aunque con una resolución temporal y celular menor.

Así se han acumulado evidencias que las vesículas son el elemento que acumula y libera a los NTS y múltiples otras sustancias, las evidencias son las siguientes: 1- Todas las sinapsis químicas presentan vesículas. 2- Vesículas sinápticas tienen mecanismos (bombas) para captar y almacenar al NT. 3- Por la técnica de microscopía electrónica por criofractura se puede correlacionar exocitosis de vesículas con el momento de la liberación. 4- Proteínas vesiculares aparecen en la membrana plasmática. 5- Drogas que inhiben o aumentan la recaptura vesicular del NT pueden aumentar o disminuir la cantidad del NT liberado. 6- Vesículas se pueden cargar con marcadores fluorescentes tomados por endocitosis y luego liberados por estimulación subsecuente. 7- Toxinas (tetánica y botulínica) que interfieren con la fusión de vesículas a la membrana celular bloquean la secreción. 8- En la mayoría de las circunstancias a nivel de la unión neuro- muscular, la liberación de una vesícula corresponde a la respuesta post-sináptica cuántica medida como un PEPS (potencial exitatorio post sináptico).



La liberación de los NT de estas vesículas y su difusión a través del espacio sináptico se realiza en 200 μ seg a nivel de la UNM. La concentración de acetilcolina a nivel sináptico puede llegar a 1 mM. Al activarse los receptores, se abren canales iónicos postsinápticos en un lapso de 1,5 msec. Desde la generación del potencial de acción presináptico hasta la aparición del postsináptico, PEPS, existe un retardo sináptico de 0,5 msec en el caso de la UNM que puede llegar hasta varios msec como es el caso de la sinapsis gigante de calamar como se ve en la gráfica (Llinas 1982). También en sinapsis rápidas del glutamato o

calamar como se ve en la gráfica (Llinas 1982). También en sinapsis rápidas del glutamato o

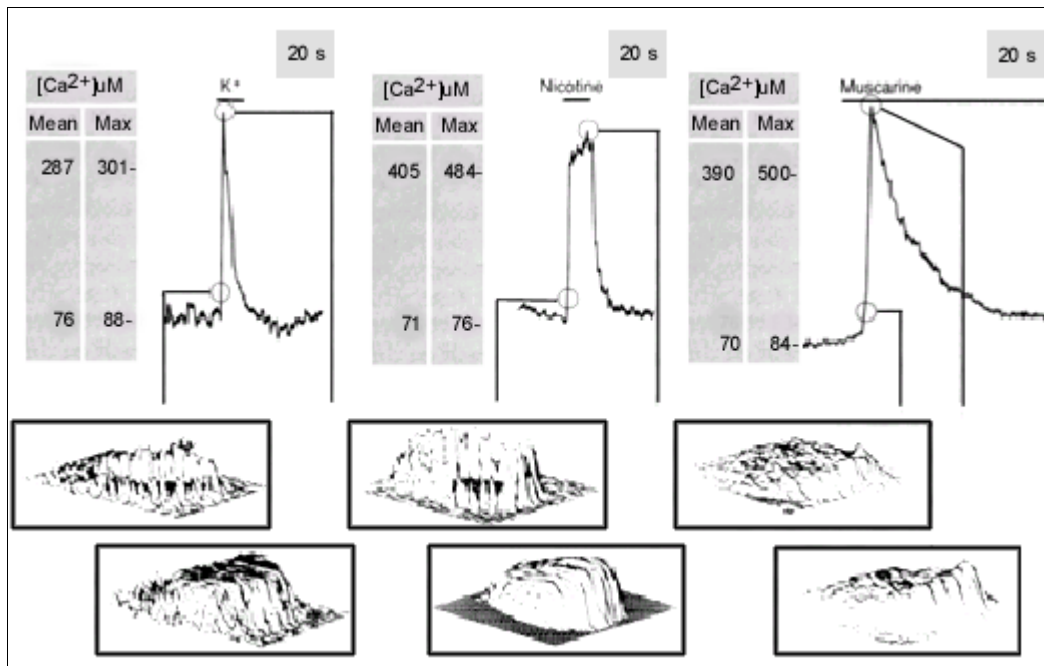
de GABA a nivel del sistema nervioso central se han descrito tiempos parecidos con una respuesta postsináptica menor.

Zona activa

La exocitosis de los terminales nerviosos como también de muchas células secretorias se realiza a nivel de una zona activa. Este concepto viene de diversos estudios de localización y cinética de activación de canales de Ca^{++} que pueden llegar a elevar de manera muy rápida (200 μseg) a concentraciones de Ca^{++} de 100 μM . Este tipo de arreglo se ha visto asociado a vesículas de transmisión rápida como son las SSV en el cual el sitio activo coincide con la sinapsis y tambien las vesículas LDCV o gránulos de transmisión más lentas, aunque no están asociados a sinapsis.

Dependencia de Ca^{++} en la exocitosis

Un elemento importante en la exocitosis es la presencia y aumento de concentración de Ca^{++} intracelular. Como se puede apreciar en la misma gráfica las corrientes de Ca^{++} suben en un lapso de mseg de concentraciones basales de Ca^{++} libre de 100 nM a concentraciones superiores 100 μM una vez depolarizada el terminal presináptico. Estos cambios en la concentración de Ca^{++} pueden variar según el tipo de estimulación y también según el tipo de célula. Así en la siguiente gráfica podemos apreciar



la respuesta de una célula cromafínica vista como señales de fluorescencia de agentes que se unen al Ca^{++} . a) muestra una despolarización por altas concentraciones de cloruro de potasio (ClK) (30 mM) que produce una rápida espiga de Ca^{++} que se observa inicialmente como una corona de la membrana plasmática de la célula y luego en su máximo se observa como un sombrero al subir las concentraciones de Ca^{++} más uniformemente en toda la célula. b) muestra la célula estimulada por nicotina, que activa

receptores ionotrópicos (es decir abre directamente canales iónicos e induce la depolarización) semejante a la respuesta a la de CLK con una rápida espiga pero de mayor amplitud y duración de la respuesta. En c) la estimulación es con muscarina, que activa receptores metabotópicos que activan a G proteínas (proteínas reguladas por nucleótidos de guanina con la consecuente activación de segundos mensajeros), aquí se observa un aumento rápido pero más uniforme a nivel de toda la membrana plasmática de la célula que se mantiene por varios segundos y presenta polarización a nivel de un lado de la célula. Estos cambios de concentración de Ca^{++} tan variados se pueden correlacionar con el proceso de exocitosis combinando diferentes técnicas de medición de corrientes de Ca^{++} con medidas de capacitancia, medición fluorométricas de Ca^{++} , con registros amperométricos y otros. De esta forma se ha podido establecer que el umbral de Ca^{++} para inducir la exocitosis puede variar desde los 300 nM en sinapsis rápidas del tipo colinérgico hasta los 100 μM en secreción lenta, de gránulos peptídicos y células secretoras.

¿A qué se debe esta variabilidad en tiempos y concentraciones de Ca^{++} necesarios para la exocitosis y sitios específicos de activación ?

El Ca^{++} se encuentra altamente regulado en todas las células para mantener un gradiente de Ca^{++} citoplasmático de 100 nM contra 2 mM de Ca^{++} extracelular y además lograr una recuperación rápida de los niveles basales una vez activada la célula.

Para lograr el aumento rápido del Ca^{++} citoplasmático se han descrito múltiples **canales de Ca^{++} voltaje sensibles (VDCC)** a nivel de la membrana celular que están involucrados con la activación y entrada de Ca^{++} , previa despolarización de la membrana, y con la subsiguiente liberación de los NTS. Estos canales VDCC, asociados a exocitosis son del tipo de N, L o P/Q dependiendo del tipo celular. Se ha podido aislar el canal de Ca^{++} tipo N y P/Q junto con la syntaxina a nivel de la membrana plasmática. También existen **canales de Ca^{++} activados por agonistas** como el glutamato, ATP y otros. Estos canales tienen cinéticas diferentes y se activan a diferentes niveles de despolarización de la membrana, lo que puede generar un patrón mas rápido o más lento de la activación de la maquinaria exocitótica. Igualmente se ha descrito su localización es **zonas activas** específicas a nivel de la membrana celular que hace que existan sitios que rápidamente (200 μseg) detecten una alta concentración de Ca^{++} ($> 100 \mu\text{M}$) al abrirse el canal durante la despolarización. Así se considera que las vesículas SSV al estar ancladas a los sitios activos en gran cercanía (alrededor de 10 nm) de los canales VSSC pueden fusionarse y liberar el NT en fracciones de mseg. Esto aparentemente también sucede cuando se estimula una célula o terminal sólo por tiempos cortos (mseg) o durante pocos potenciales de acción y se fusionan las vesículas del tipo SSV y ocurre así una liberación moderada y muy localizada. Una despolarización más fuerte o prolongada y/o la movilización de Ca^{++} intracelular puede incrementar las concentraciones de Ca^{++} citoplasmáticas de manera uniforme y de esta manera inducir la exocitosis de las vesículas del tipo de LDCV o gránulos peptídicos. Este tipo de liberación es obviamente más lenta, con un retardo hasta de 10 seg como en el caso de los gránulos en células acinares.

Un factor fundamental en la regulación del Ca^{++} citoplasmático son los canales de Ca^{++} de

organelas intracelulares. Así existen los **canales de tipo IP3** activados por receptores metabotrópicos ligados a la activación de la fosfolipasa C y a la cascada de dos mensajeros del tipo de IP3. Estos canales son capaces de liberar Ca^{++} e inducir exocitosis con una cinética más lenta y por tiempos más prolongados. También los **canales de Ca^{++} del tipo de rianodina** han sido asociados con la regulación de la liberación en diferentes tipos de células y terminales nerviosos. Aparentemente la activación de la liberación de sustancias de células endocrinas y exocrinas dependen más de la activación de este tipo de canales intracelulares y aumento del Ca^{++} citoplasmático que de la activación por canales de Ca^{++} de membrana plasmática es decir de la entrada de Ca^{++} externo.

Otro elemento muy importante en la regulación de las concentraciones internas de Ca^{++} y la regulación de la exocitosis son los **tampones citoplasmáticos de Ca^{++}** . Así se han descrito diversas proteínas capaces de ligar el Ca^{++} y regular los niveles de Ca^{++} citoplasmático entre ellos se encuentra la calmodulina, parvalbumina, calretinina, calbindina, entre otros. Todas estas proteínas tienen una distribución y cinética diferenciales y son capaces de regular de manera específica el mecanismo de liberación. Estos tampones hacen también que la difusión del Ca^{++} al entrar a la célula por sus canales específicos se mantenga localizado en los sitios activos, así un estímulo corto de pocos potenciales de acción sólo será capaz de inducir una liberación localizada de vesículas ya ancladas a la membrana. Este es el caso en general de la transmisión rápida del tipo de las vesículas SSV. En el caso de un estímulo mayor y por más tiempo para elevar las concentraciones de Ca^{++} citoplasmático de forma más uniforme también se logra activar las vesículas o gránulos mas alejados del sitio activo e induce su exocitosis como es el caso de las vesículas del tipo LDCV y los gránulos peptídicos.

Los mecanismos de liberación rápidos y transitorios del tipo de la liberación de SSV y la liberación más lenta y prolongada de las LDCV también se pueden explicar por la asociación con receptores de Ca^{++} (proteínas específicas que unen el Ca^{++} y están ligadas a la maquinaria exocitótica) de baja afinidad para el mecanismo rápido y transigente y de alta afinidad para la liberación lenta. No está claro cuáles son las proteínas que están ligadas a uno u otro proceso pero deben ser múltiples proteínas.

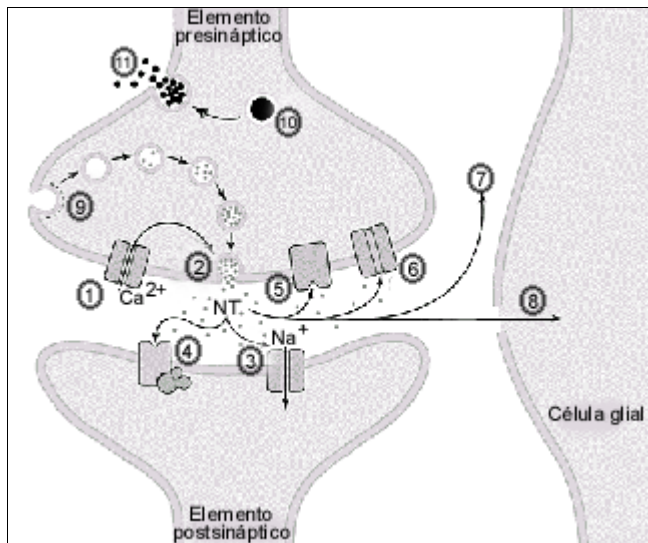
Liberación de varios neurotransmisores o sustancias de un mismo terminal o célula

Un mismo terminal nervioso o célula puede tener diferentes tipos de vesículas cada una con un tipo de neurotransmisor. Estas vesículas son liberadas con una cinética diferente como se explica arriba, así las vesículas pequeñas, son las primeras en liberarse y ejercen su función en el espacio sináptico o extracelular seguidas por la liberación de las vesículas mas lentas, con función prolongando y potenciando el efecto primario; también pueden tener acciones inhibitorias regulando negativamente el efecto del primer neurotransmisor liberado.

Regulación sináptica de la liberación

Como hemos visto arriba la liberación y específicamente la exocitosis tienen muchos elementos involucrados en su mecanismo que pueden ser regulados. Una forma muy importante de regulación de la liberación es por **fosforilación** de múltiples proteínas

asociadas al proceso de exocitosis. Así la quinasa activada por la calmodulina (CaMKII) puede fosforilar a sinaptofisina, sinaptobrevina, synaptotagmina, rafilina, SNAP, NSF, syntaxina, y también canales de Ca^{++} tipo N. La quinasa proteína C fosforila a sinaptobrevina, rabphilina, SNAP 25, Munk 18 y canales de Ca^{++} tipo N. La quinase de caseína fosforila a sinaptotagmina y la syntaxina. La quinasa dependiente de ciclina fosforila a Munk 18.



Además de los mecanismos de fosforilación que regulan la liberación, existen diversos factores presinápticos que modulan directa o indirectamente la liberación. Así tenemos (1) la entrada de Ca^{++} que es primordial en la exocitosis. Una vez liberado el NT (2) es capaz de actuar a nivel post-sináptico a nivel de los receptores específicos ionotrópicos y metabotrópicos (3-4), nivel presináptico.

A nivel presináptico los NTS pueden activar hetero-receptores presinápticos que son capaces de inhibir o aumentar la liberación de NTS. También a nivel presináptico

encontramos los auto-receptores (5), es decir los que son activados por el mismo NTS del terminal. De esta manera el NTS ejerce una retro alimentación negativa y en ciertos casos excepcionales, retro alimentación positiva, del proceso de liberación. Los transportadores del NTS a nivel de la membrana plasmática (6) ayudan a eliminar el NTS del espacio sináptico y así regulan la respuesta del NTS a nivel post-sináptico. Este transportador es capaz de funcionar de manera reversa, es decir no recaptura al NTS sino lo libera al espacio extracelular. Esto se ve en algunas situaciones como despolarización prolongada, aumento de la concentración citoplasmática del NT o inducido por drogas específicas que actúan sobre el transportador. Este tipo de liberación no es Ca^{++} dependiente sino depende del gradiente del sodio (Na). A nivel presináptico también se efectúa la síntesis y llenado de las vesículas (9) como fue descrito arriba. A este nivel también se regula la liberación en el sentido que existen condiciones en las cuales farmacológicamente o por toxinas no se obtiene el reciclaje (endocitosis) de las vesículas o su llenado normal. Esto se refleja en una disminución o bloqueo de la liberación. Las vesículas densas o los gránulos peptídicos tienen mecanismos de regulación particulares (10) que no siempre coinciden con los de las vesículas pequeñas. Así la dependencia de Ca^{++} de ellas es de baja afinidad, más lento y la exocitosis no se realiza a nivel de sinapsis, siendo activado por estímulos de más intensidad y mas prolongado (mayor frecuencia de estimulación). Igualmente los NTS peptídicos no tienen el sistema de recaptura descritos para los NTS clásicos ni a nivel de la membrana plasmática, ni a nivel de las vesículas por lo que no tienen el tipo de liberación Ca^{++} independiente, por reversión del transportador.

REFERENCIAS

- Albert B., Brat D., Lewis J., Raff M., Roberts K and Watson J.D. Molecular biology of the

cell . 1983 . Garland publishing Inc.

- **Bajjalieh S.M**, Synaptic vesicle docking and fusion. 1999. Current opinion in Neurobiology 9:321-328.
- **Burgoyne R D. and Morgan A** Ca^{2+} and secretory-vesicle dynamics. 1995 Trends. Neurosci. 18:191- 196.
- **Kasai H**. Comparative biology of Ca^{++} dependent exocytosis: implications of kinetic diversity for secretory function 1999. Trends. Neurosci. 22 #2:88-93.
- **Llinas R. 1982** Calcium in synaptic transmission Sci. Am. 247:56-65.
- **Nicholls D.G**. Proteins, transmitters and synapses. 1994, Blackwell scientific publications.
- **Suedhof T.C.**, The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. 1995. Nature 375:645-653.
- **Zucker RS, Kullmann D M, and Bennett M**. Release of neurotransmitters. In Fundamental Neuroscience. 1999 Eds. Zigmund, Bloom, Landis,Roberts and Squire. Academic Press.