

Débora Lopes da Costa Oliveira

**Ciclo de Vesículas Sinápticas com Conteúdo
Reduzido em Junção Neuromuscular**

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 2007.

Débora Lopes da Costa Oliveira

Ciclo de Vesículas Sinápticas com Conteúdo Reduzido em Junção Neuromuscular

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Cristina Guatimosim Fonseca

Belo Horizonte, 2007.

*“É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão
dentro de nós,
onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão.
O importante é aproveitar o momento
e aprender sua duração,
pois a vida está nos olhos de quem sabe ver”.*

Gabriel Garcia Marquez

Apoio Institucional

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Aos meus pais, Oldach e Sandra, aos meus irmãos, Gabriel e Pedro,
aos meus avós, Belato e Martha,
com muito carinho!**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar e abençoar meu caminho.

Aos meus pais, Oldach e Sandra, pelo amor e força incondicionais, pela amizade, dedicação, exemplo e compreensão.

Aos meus irmãos, Gabriel e Pedro, pela amizade, carinho e paciência.

Aos meus avós, Belato e Martha, pelo exemplo, amor e incentivo.

Às minhas amigas do coração, Rê, Vi e Paula, sem as quais meu caminho se tornaria mais difícil.

Aos meus grandes amigos do laboratório de Biologia da Neurotransmissão: Bento João, Ernani e Luciana; em especial ao Ernani pela presença e ensinamentos. Agradeço a todos vocês pelo incentivo, amizade e bons momentos de descontração!

Aos colegas do laboratório de Neurofarmacologia, em especial ao Paulo Henrique, Janice e Célio.

Ao Paulo Henrique Costa Diniz pela expressiva colaboração.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Biologia Celular, em especial à Paula e Cynthia.

Aos Professores Marco Antônio Prado e Marcus Vinícius Gomez pela colaboração.

Aos Professores Antônio Mourthé Filho e Virgínia Maria Vidigal, os quais muito admiro e agradeço pelo incentivo, amizade, exemplo e colaboração.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1- INTRODUÇÃO.....	15
1.1 – Morfologia da Junção Neuromuscular e das Vesículas Sinápticas.....	15
1.2 – Ciclo Sináptico na Junção Neuromuscular.....	20
1.3 – Neurotransmissão Colinérgica.....	25
1.4 – Monitoramento do Ciclo de Vesículas Sinápticas Utilizando o Marcador Fluorescente FM1-43.....	28
1.5 – Utilização de Drogas que Reduzem o Conteúdo Vesicular de ACh.....	30
2- OBJETIVOS.....	33
2.1 – Objetivo Geral.....	33
2.2 – Objetivos Específicos.....	33
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 – Isolamento da Preparação de Junção Neuromuscular de Rã.....	34

3.2 – Marcação de Vesículas Sinápticas com FM1-43.....	34
3.3 – Análise dos Efeitos do Vesamicol, Cloreto de amônio e Metilamina sobre Endocitose.....	35
3.4 – Análise dos Efeitos do Vesamicol, Cloreto de amônio e Metilamina sobre Exocitose Evocada.....	35
3.5 – Obtenção e Análise de Imagens.....	35
3.6 – Determinação da Liberação de [³ H]-ACh em Fatias de Córtex Cerebral de Ratos.....	36
3.6.1 Obtenção das Fatias do Córtex Cerebral.....	36
3.6.2 Marcação das Fatias com [³ H]ACh.....	36
3.6.3 Lavagem das Fatias com Colina Fria.....	37
3.6.4 Estimulação das Fatias.....	37
3.6.5 Contagem da Radioatividade do Sobrenadante.....	37
3.6.6 Análise Estatística dos Resultados.....	37
4 – RESULTADOS.....	38
4.1 – Marcação dos Aglomerados Vesiculares com FM1-43.....	38
4.1.1- Marcação dos Aglomerados Vesiculares na Presença de Vesamicol.....	38
4.1.2- Marcação dos Aglomerados Vesiculares na Presença de Cloreto de amônio.....	39
4.1.3- Marcação dos Aglomerados Vesiculares na Presença de Metilamina.....	40
4.2 – Desmarcação dos Aglomerados Vesiculares.....	41
4.2.1- Fotodesmarcação.....	41

4.2.2- Vesamicol não Interfere na Liberação Vesicular Evocada por Solução Despolarizante.....	42
4.2.3- NH ₄ Cl não Interfere na Liberação Vesicular Evocada por Solução Despolarizante.....	44
4.2.4-Metilamina não Interfere na Liberação Vesicular Evocada por Solução Despolarizante.....	47
4.3- Liberação de Acetilcolina em Fatias de Córtex Cerebral de Rato.....	49
5 –DISCUSSÃO.....	51
6 – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	59
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

Lista de Abreviaturas

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ATP	Adenosina trifosfato
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Ca ²⁺	Íon cálcio
CCD	<i>Charge- coupled device</i>
ChAT	Colina acetiltransferase
Cl ⁻	Cloreto
DMPP	1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium
EPP	<i>Evoked endplate potential</i>
FM1-43	<i>N-(3-triethylammonium-propyl)-4-(dibutylamino)-styryl)pyridinium dibromide</i>
g	Gravidade(s) – força
HCl	Ácido clorídrico
H ⁺	Íons hidrogênio
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazida-N'-2-etanosulfônico
H ⁺ V-ATPase	Bomba vesicular de íons hidrogênio
JNM	Junção neuromuscular
KCl	Cloreto de potássio
MEPPs	<i>Miniature end plate potentials</i>
MEPCs	<i>Miniature endplate currents</i>
µg/mL	Micro grama(s) por mililitros
µL	Micro litro(s)
µM	Micromolar
M	Molar
mg	Mili grama(s)
Mg ²⁺	Íon magnésio
min	Minutos
mL	Mili litro(s)

mm	Milímetro
mM	Mili molar
nm	Nanômetros
N	Normal
nAChRs	Receptor nicotínico de acetilcolina
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ ⁺	Íon Amônio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
RP	<i>Reserve Pool</i>
Rpm	Rotação por minuto
RRP	<i>Readily Releasable Pool</i>
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>
T-SNARE	<i>Target SNARE</i>
u.a	Unidades arbitrárias
VAcHT	Transportador vesicular da acetilcolina
VGLUT	Transportador vesicular de glutamato
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
VS	Vesícula(s) Sináptica(s)
V-SNARE	<i>Vesicular SNARE</i>
ΔpH	gradiente de pH
ΔΨ	potencial de membrana

Lista de Figuras

Figura 1 – Micrografia eletrônica de uma sinapse química de JNM.....	16
Figura 2 – Modelo molecular de uma vesícula sináptica mostrando a diversidade de proteínas envoltas.....	19
Figura 3 – Ciclo de exocitose-endocitose de uma vesícula colinérgica.....	22
Figura 4 – Modelos de endocitose de vesículas sinápticas em junção neuromuscular...24	
Figura 5 – O marcador fluorescente FM1-43 é utilizado para monitoramento dos passos de endocitose e exocitose de vesículas sinápticas.....	30
Figura 6 – Vesamicol não interfere com a internalização do FM1-43.....	39
Figura 7 – NH ₄ Cl não interfere com a internalização do FM1-43.....	40
Figura 8 – Metilamina não interfere com a internalização do FM1-43.....	41
Figura 9 – Vesamicol não interfere na liberação vesicular evocada por KCl, havendo conseqüente desmarcação de terminações axonais contendo FM1-43.....	43
Figura 10 – NH ₄ Cl não interfere na liberação vesicular evocada por KCl, havendo conseqüente desmarcação de terminações axonais contendo FM1-43.....	46
Figura 11 – Metilamina não interfere na liberação vesicular evocada por KCl, havendo conseqüente desmarcação de terminações axonais contendo FM1-43.....	48
Figura 12 – Efeito das drogas vesamicol, NH ₄ Cl e metilamina, que promovem depleção de neurotransmissores da vesícula sináptica, na liberação de [³ H]-ACh em fatias de córtex cerebral de rato.....	50

Resumo

A captação de neurotransmissores para o interior das vesículas sinápticas (VS) é um processo ativo, direcionado pelo gradiente próton eletroquímico, o qual é a soma de dois componentes: o gradiente de pH (ΔpH) e o potencial de membrana ($\Delta\Psi$), gerado através da atividade da H^+ V-ATPase. Neste trabalho, investigou-se os efeitos de drogas que alteram o preenchimento de VS com acetilcolina no ciclo sináptico. Junções neuromusculares de rã foram expostas à sonda fluorescente FM1-43, que permite uma visualização direta e dinâmica do ciclo sináptico. Este marcador consiste em uma molécula anfipática com uma cauda hidrofóbica que promove a ligação da sonda à membrana do terminal axonal. Após um estímulo despolarizante, a membrana marcada com FM1-43 é internalizada por endocitose compensatória de modo que os aglomerados vesiculares podem ser visualizados por meio de microscopia de fluorescência sob a forma de pontos fluorescentes. Estimulação adicional na ausência de FM1-43 permite acompanhar e mensurar a exocitose. Vesamicol, NH_4Cl e metilamina, não interferiram de maneira significativa na marcação dos terminais sinápticos com FM1-43 durante estímulo despolarizante com KCl (60mM). Da mesma forma, a exocitose de VS não foi afetada pelas drogas. Logo, nossos resultados sugerem que VS com conteúdo reduzido de neurotransmissor são endocitadas, recicladas e exocitadas de maneira indistinguível daquelas VS com conteúdo quantal preservado. Os resultados obtidos com esta investigação dinâmica do ciclo sináptico poderão nortear abordagens celulares e moleculares que esclareçam como as drogas estudadas interferem com a maquinaria protéica que regula os passos de exocitose e endocitose de vesículas sinápticas.

Abstract

Neurotransmitter uptake into synaptic vesicles (SV) is an active process, driven by an electrochemical proton gradient which is the sum of two compounds: a pH gradient (ΔpH) and a membrane potential ($\Delta\Psi$), generated by a V- type H^+ -ATPase. In this study, we investigated whether recycled cholinergic synaptic vesicles, which were not refilled with ACh after treatment with a vesicular ACh transporter blocker (vesamicol) or with membrane permeant weak bases that collapses ΔpH like ammonium chloride and methylamine, would join other SV in the readily releasable store near active zones, dock, and continue to undergo exocytosis during prolonged stimulation. Neuromuscular junctions were exposed to FM1-43, a fluorescent styryl dye, allowing a direct and dynamic observation of synaptic cycle. Cutaneus-pectoris muscles preparations were treated with $2\mu\text{M}$ vesamicol, 30mM ammonium chloride or 10M methylamine to inhibit the quantal size and then were exposed to an elevated potassium solution (60mM KCl) to release all preformed quanta of ACh. At treated and controls endplates, nerve terminals accumulated the activity-dependent dye FM1-43 when exposed to the dye during stimulation, indicating SV endocytosis. After another exposure in 60mM KCl, nerve terminals that were treated with the drugs released the dye, confirming that exocytosis also still occurred. These results demonstrate that recycled cholinergic synaptic vesicles that were not refilled with ACh continued to dock and undergo exocytosis after membrane retrieval. Thus transport of ACh into recycled cholinergic vesicles and acidification mechanisms are not a requirement for repeated cycles of exocytosis and retrieval of synaptic vesicle membrane during prolonged stimulation of motor nerve terminals. These results can guide cellular and molecular approaches to elucidate how these drugs interfere at protein machinery that regulates the steps of exocytosis and endocytosis of synaptic vesicle.

1 – Introdução

1.1 – Morfologia da Junção Neuromuscular e das Vesículas Sinápticas

As sinapses químicas das JNM são junções celulares especializadas entre neurônios e seus alvos, designados para transmissão rápida e eficiente de informação. Essas sinapses são compostas por um terminal pré-sináptico preenchido com vesículas sinápticas (VS) contendo neurotransmissor, uma fenda sináptica e um aparato de recepção pós-sináptico. A região da membrana plasmática pré-sináptica na qual as VS se ancoram, fundem-se com a membrana e liberam neurotransmissores é chamada de zona ativa. O aparato de recepção pós-sináptico, justaposto a zonas ativas, contém aglomerados de receptores de neurotransmissores e canais iônicos e é referido como densidade pós-sináptica (Garner *et al.*, 2000) (Figura 1). A exocitose de vesículas ocorre na zona ativa e a subsequente recuperação endocítica dos componentes vesiculares pode ocorrer tanto na zona ativa quanto na área da zona peri-ativa (Roos & Kelly, 1999). Este arranjo garante a liberação exocitótica de neurotransmissores próxima a seus receptores pós-sinápticos e permite que o processo de liberação ocorra numa dinâmica apropriada (Murthy & De Camilli, 2003).

Para que a exocitose ocorra é necessária a maturação vesicular. Esta envolve acidificação do lúmen, preenchimento com neurotransmissor, associação com proteínas periféricas de membrana necessárias para exocitose e recaptção para o aglomerado de VS. Este aglomerado de vesículas está localizado numa área rica em actina e geralmente próximo a mitocôndrias, as quais provêm energia para o ciclo de vesículas. As sinapses são também circundadas por células gliais, as quais desenvolvem papéis auxiliares como secreção de fatores neuromodulatórios, regulação da concentração iônica extracelular e captação de neurotransmissores (Haydon, 2001).

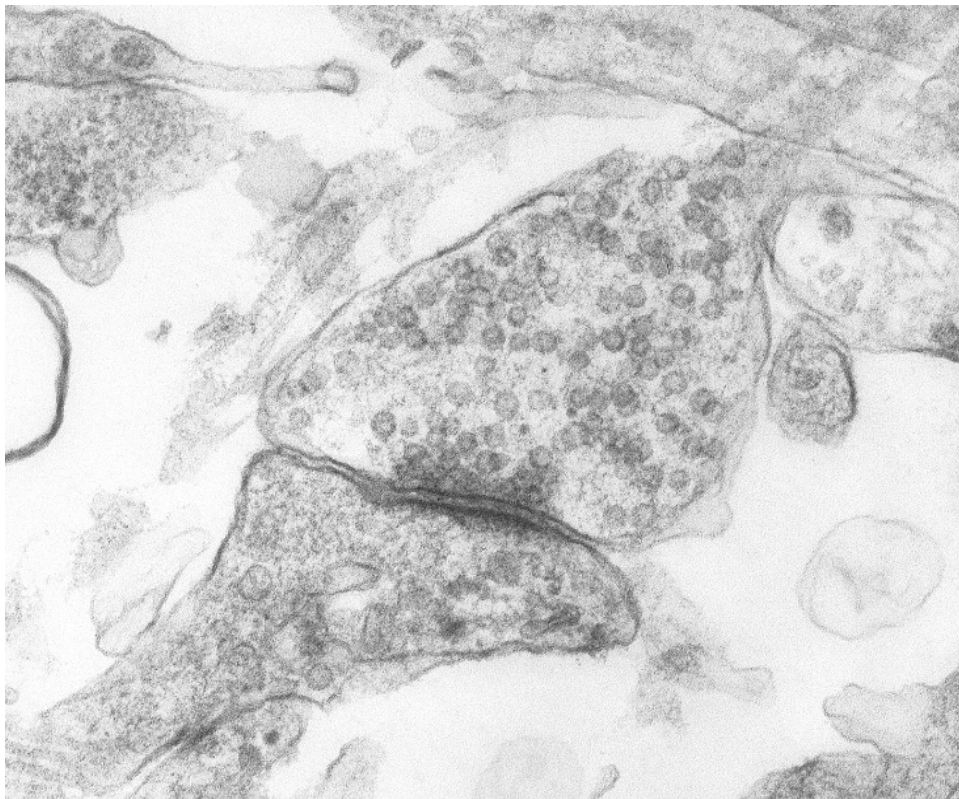


Figura 1: Micrografia eletrônica de uma sinapse química de JNM. Um botão pré-sináptico típico é uma porção especializada do axônio, sendo caracterizado por uma zona ativa, região onde a membrana plasmática pré-sináptica está em íntimo contato com a membrana pós-sináptica, separadas pela fenda sináptica, e contém um aglomerado de vesículas associadas (De Camilli *et al.*, 2001). No plano ultraestrutural, a zona ativa tem uma aparência densa, refletindo a presença da malha de proteínas pré-sinápticas (Pfenninger *et al.*, 1969). Algumas poucas vesículas estão adjacentes à zona ativa e são referidas como vesículas ancoradas.
(www.univ-orleans.fr/.../GALERIE/synapse.jpg)

As vesículas sinápticas são organelas de aproximadamente 40nm, possuindo uma diversidade surpreendente de proteínas e, com exceção da V-ATPase que está presente apenas em uma ou duas cópias, contêm numerosas cópias de proteínas essenciais para o tráfego de membrana e captação de neurotransmissor. O transporte vesicular, reconhecimento do alvo, ancoragem e fusão envolvem recrutamento ordenado e seqüencial de complexos protéicos a partir do citoplasma (Takamori *et al.*, 2006). Nos últimos anos, muitas proteínas envolvidas nestas reações foram descritas (Sudhof, 2004; Bonifacino & Glick, 2004), todavia, pouco se sabe sobre a completa estrutura de membrana, incluindo a concentração de proteínas integrais de membrana ou associadas a esta, e sobre a densidade de superfície de proteínas de tráfego como as SNAREs

[soluble-N-ethyl-maleimide sensitive factor (NSF) – attachment protein receptor] e Rabs (Takamori *et al.*, 2006).

As vesículas sinápticas contêm a maquinaria necessária para a captação e armazenamento de neurotransmissor, incluindo transportadores vesiculares, canais iônicos e a V-ATPase que abastece os transportadores (Ahnert-Hilger *et al.*, 2003). Mais de oitenta proteínas integrais de membrana foram identificadas, sendo que destas, aproximadamente quarenta são residentes das VS. Em adição às proteínas do complexo SNARE como synaptobrevina/VAMP2, syntaxina 1 e SNAP-25, as quais são conhecidas pela função relevante na exocitose, um total de vinte diferentes SNAREs foram identificadas. As SNAREs trabalham também em outros passos da fusão como fusão de endossoma precoce ou tardio, sustentando a idéia de que as VS se comunicam com intermediários endossomais pelo menos em algum momento do seu ciclo de vida. A syntaxina e a SNAP-25 estão presentes na membrana pré-sináptica e, por isso, são designadas como t-SNAREs (*target SNAREs*). Já a sinaptobrevina situa-se na membrana das vesículas, sendo então designada como v-SNARE (*vesicular SNARE*). Essas três proteínas regem, por meio do seu entrelaçamento e estabelecimento de um complexo heterotrimérico, o ancoramento e a fusão vesicular com a membrana pré-sináptica, possibilitando a liberação regulada de neurotransmissor (Murthy & De Camilli, 2003; Sudhof, 2004). Inúmeras Rabs foram identificadas e são consideradas os marcadores específicos da organela. Um grande número de proteínas periféricas foi também identificado, incluindo proteínas envolvidas em vias de sinalização como GTPases triméricas, quinases, fosfatases, proteínas do citoesqueleto, enzimas metabólicas e chaperonas (Takamori *et al.*, 2006). As GTPases heterotriméricas participam na regulação da captação de neurotransmissor vesicular (Ahnert-Hilger *et al.*, 2003) e as proteínas do citoesqueleto estão envolvidas no transporte vesicular. A sinaptotagmina I (Syt I) é amplamente conhecida como sensor primário de cálcio para exocitose de VS (Perin *et al.*, 1990; Brose *et al.*, 1992; Littleton *et al.*, 1993; Geppert *et al.*, 1994; Fernandez-Chacon *et al.*, 2001), todavia estudos bioquímicos prévios sugerem que Syt I pode também funcionar durante a endocitose de VS (Zhang *et al.*, 1994; Fukuda *et al.*, 1995; Jorgensen *et al.*, 1995; Reist *et al.*, 1998; Haucke & De Camilli, 1999; Haucke *et al.*, 2000; Von Poser *et al.*, 2000; Fergestad & Broadie, 2001; Littleton *et al.*, 2001; Jarousse *et al.*, 2001).

Baseando-se em parâmetros físicos e na composição da VS, Takamori *et al.*, 2006, construíram um modelo molecular de um protótipo de VS (Figura 2). Uma VS

típica contém 70 sinaptobrevinas, 32 sinaptofisinas, 9 a 14 transportadores de neurotransmissor, 10 Rab3As, 8 sinapsinas e 15 sinaptotagminas, dentre outras. O número de todas as moléculas de fosfolipídios e colesterol por VS foi calculado, sendo de aproximadamente 7000 e 5600, respectivamente.

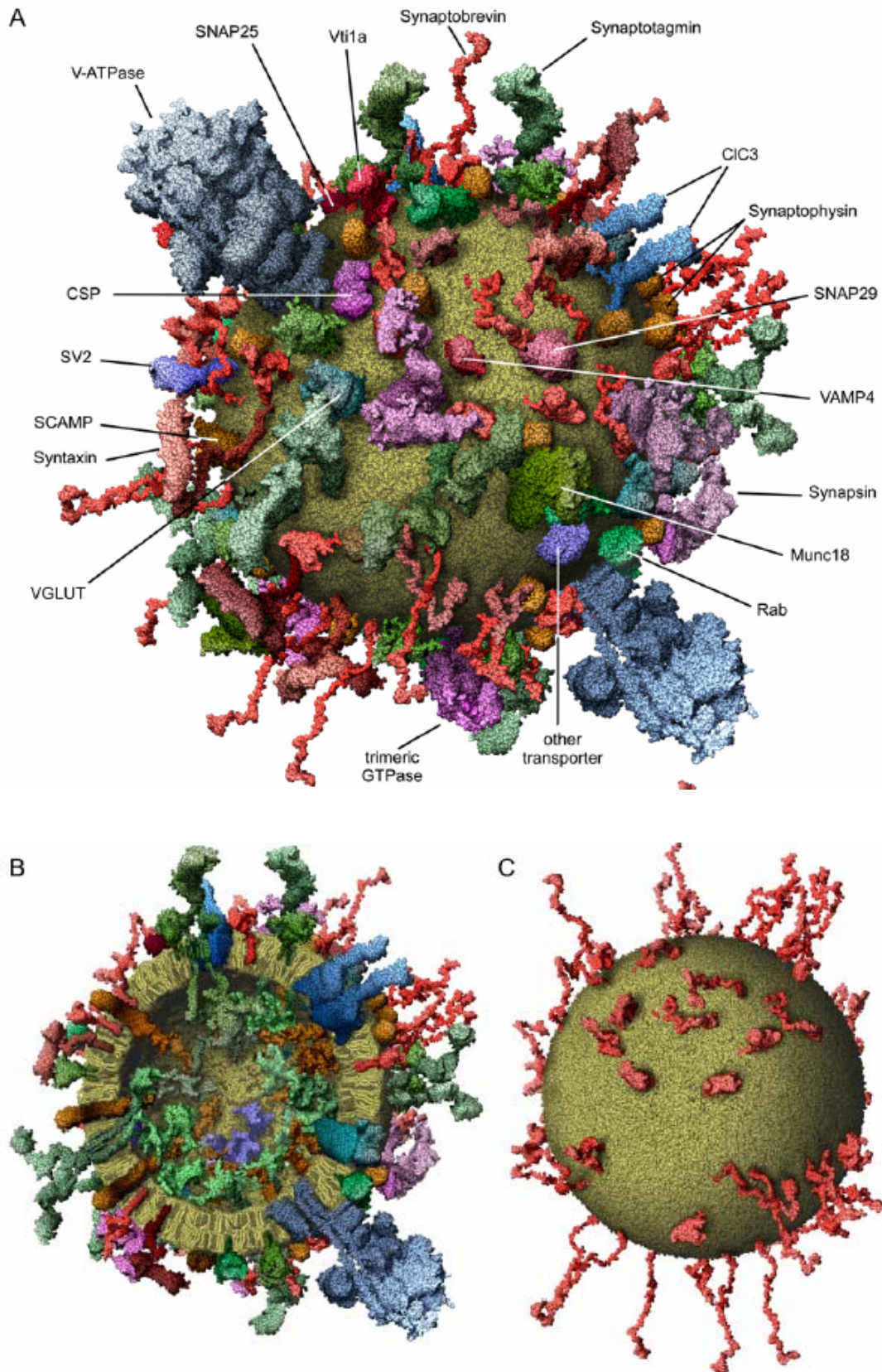


Figura 2: Modelo molecular de uma vesícula sináptica mostrando a diversidade de proteínas envolvidas. (A) Vista externa de uma VS. (B) Vista de uma VS seccionada ao meio (os componentes da membrana corados em escuro representam o colesterol). (C) Modelo contendo apenas sinaptobrevina para demonstrar a densidade de superfície do componente vesicular mais abundante (Takamori *et al.*, 2006)

1.2 - Ciclo Sináptico na Junção Neuromuscular

Como vimos, uma das características que define uma sinapse química é a coleção de vesículas sinápticas no terminal pré-sináptico. Essas vesículas participam de um ciclo que permite que elas sejam usadas repetitivamente durante atividade sustentada. Em uma sinapse típica em repouso, uma pequena porcentagem de VS está fixada à membrana pré-sináptica. Todas as VS se assemelham na microscopia eletrônica e não há nenhuma distinção bioquímica significativa que permita a identificação de diferentes classes de VS em um terminal em repouso. Assim, apesar de terem algumas VS ancoradas à superfície da membrana, a grande maioria parece constituir uma população única, homogênea (Rizzoli & Betz, 2005). A liberação de neurotransmissores das VS e a ativação dos receptores desses neurotransmissores contribuem para a transmissão da informação do elemento pré-sináptico para o alvo pós-sináptico. Há um número finito dessas VS em cada sinapse e é através da reciclagem dessas que a neurotransmissão contínua é possível (Poskanser & Davis, 2004). Todavia, demonstrou-se que há diferentes populações de VS com propriedades funcionais distintas e estes grupos são liberados e reutilizados sob diferentes condições (Sudhof, 2000, Rizzoli & Betz, 2005). Sabe-se que em junção neuromuscular de rã, a população vesicular total contém aproximadamente 500000 vesículas, sendo possível encaixar cada uma delas em uma de três populações: população de liberação rápida (RRP), população de reciclagem e população de reserva (RP) (Rizzoli & Betz, 2005).

O RRP é constituído por vesículas sinápticas que estão prontamente disponíveis para liberação, constituindo cerca de 1 a 2% da população total de VS. Essas VS estão geralmente ancoradas na zona ativa e sofrem exocitose imediatamente após estimulação. Esta população de VS é depletada rapidamente pela estimulação elétrica de alta frequência ou por soluções despolarizantes. A maquinaria da zona ativa interage de forma complexa com as VS ancoradas, as quais promovem interação de componentes vesiculares com canais para cálcio dependentes de voltagem, resultando em uma rápida liberação. Já a população de reciclagem é definida como sendo uma população de VS que mantêm a liberação sob estimulação moderada (fisiológica). Esta população contém cerca de 5-20% de todas as vesículas e cicla continuamente, sendo preenchida novamente com VS recentemente sintetizadas. Em junção neuromuscular de rã, o RRP é uma parte integral da população de reciclagem, uma vez que a velocidade de recuperação do RRP depende da velocidade de reenchimento da população de reciclagem. O RP é um depósito de VS no qual a liberação destas acontece somente

durante estimulação prolongada. Essas VS constituem a maioria das vesículas do terminal pré-sináptico (80-90%). É possível que estas VS sejam raramente ou nunca recrutadas durante atividade fisiológica, sendo somente liberadas quando a população de reciclagem tiver sido depletada. Vale salientar que nos terminais em repouso, a maioria das VS encontra-se imóvel devido à ação da proteína sinapsina. Uma vez que o RP encontra-se distante da zona ativa, essas VS precisam se movimentar para serem excitadas (Rizzoli & Betz, 2005). Se estas VS encontram-se ancoradas em repouso, como elas se movem em direção à zona ativa durante estimulação? Parece que esta atividade se inicia através de uma seqüência de eventos (entrada de Ca^{+2} → ativação de calmodulina quinase II → fosforilação da sinapsina 1) que leva à liberação das VS de sua ligação com sinapsina 1 (Llinas *et al.*, 1985, 1991). Há dois modelos que explicam sua exocitose: movimento direto em direção à zona ativa com auxílio do citoesqueleto de actina e difusão aleatória (Rizzoli & Betz, 2005).

Durante a neurotransmissão, as vesículas sinápticas organizadas em populações vesiculares passam por um ciclo nos terminais nervosos, podendo ser dividido em passos seqüenciais (Figura 3): inicialmente os neurotransmissores são transportados para o interior das vesículas sinápticas, as quais se agrupam nas adjacências da zona ativa, onde irão ancorar-se e tornar-se-ão competentes para a fusão e liberação de seu conteúdo na fenda sináptica (revisado por Sudhof, 2004). A liberação de ACh, por exemplo, é um processo dependente de cálcio e é ativado pelo aumento na concentração de Ca^{2+} livre dentro do terminal nervoso. Isto resulta na abertura de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem pela despolarização do impulso nervoso. Em adição aos canais para Ca^{2+} , muitos tipos de canais para potássio encontram-se presentes no terminal nervoso, incluindo canais para potássio dependentes de voltagem e os ativados por Ca^{2+} . Os canais para potássio parecem limitar a duração da despolarização do terminal nervoso e assim, a extensão da entrada de Ca^{2+} e liberação de transmissor (Naguib *et al.*, 2002). Além da ACh, ATP é também liberado e subsequentemente hidrolizado em poucos minutos em adenosina na fenda sináptica (Smith, 1991). A exocitose de VS ocorre em passos sucessivos. VS se ancoram (docking) na zona ativa, posteriormente sofrem reação de amadurecimento (priming) para se tornarem capazes de responder ao Ca^{2+} e competentes à fusão. O potencial de ação causa despolarização da membrana e acentuado aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} através de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem. Este Ca^{2+} ativa a fusão das VS com a membrana pré-sináptica e subsequente exocitose. A seqüência desta é muito rápida (< 0.3 ms) (Katz, 1969).

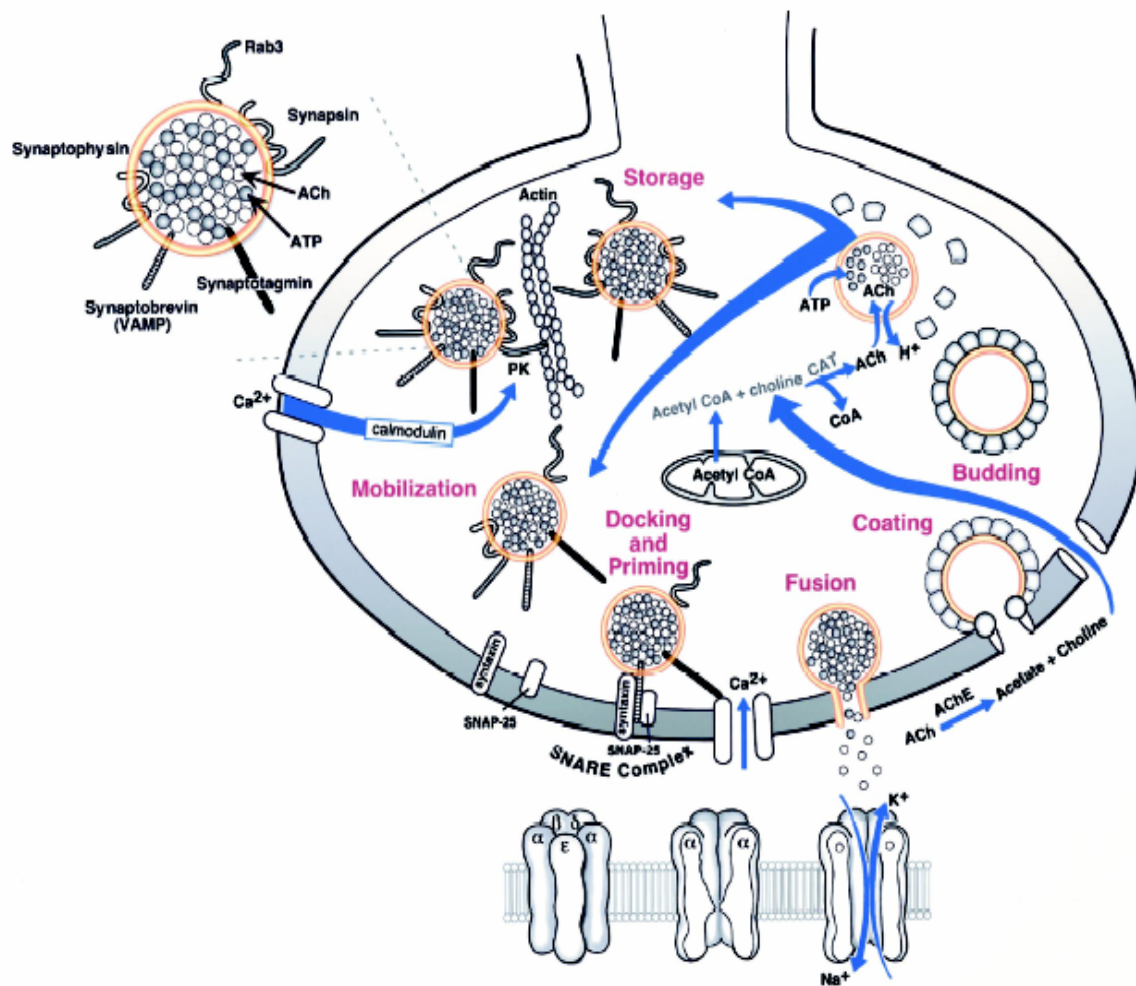


Figura 3: Ciclo de exocitose-endocitose de uma vesícula colinérgica. Após potencial de ação e influxo de Ca^{2+} , fosforilação da sinapsina é ativada por proteínas quinases ativadas por cálcio-calmodulina I e II. Isto resulta na mobilização de VS a partir do citoplasma em direção à membrana pré-sináptica. A formação do complexo SNARE é um passo essencial para o processo de ancoragem. Após fusão das VS com membrana pré-sináptica, ACh é liberada na fenda sináptica. Algumas moléculas de ACh se ligam a nAChRs na membrana pós-sináptica, ao passo que o resto é rapidamente hidrolizado pela acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda sináptica em colina e acetato. Colina é reciclada, estando disponível para a resíntese de ACh. Exocitose é seguida pela endocitose em um processo dependente da formação de capa de clatrina e da ação da dinamina. Após recuperação da membrana da VS, a vesícula perde seu revestimento e um outro ciclo recomeça (Naguib *et al.*, 2002).

Após a exocitose de seu conteúdo, as vesículas sinápticas sofrem endocitose e reciclagem por uma de três vias alternativas (Figura 4): (a) endocitose mediada por capa de clatrina (Heuser & Reese, 1973; Richards *et al.*, 2000); (b) endocitose por meio de amplas invaginações de membrana e formação de cisternas (Takei *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 2000; 2003); (c) endocitose designada como *Kiss and Run* na qual vesículas liberam seu conteúdo sem se integrarem completamente à membrana pré-sináptica, sendo reacidificadas e novamente preenchidas por neurotransmissores (Ceccarelli, *et al.*, 1973; Pyle *et al.*, 2000; Gandhi & Stevens, 2003). Estudos recentes sugerem que a força de direcionamento para a invaginação da membrana pode ser provida por adaptadores de clatrina e pelos fatores acessórios que têm habilidade intrínseca para gerar curvatura da membrana (Farsad *et al.*, 2001; Ford *et al.*, 2002). Estes componentes ajudam também a produzir vesículas de tamanho homogêneo, possivelmente induzindo um grau máximo de curvatura de membrana (Zhang *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1999; Takei *et al.*, 1999; Ford *et al.*, 2002).

Dois estudos clássicos de reciclagem de VS, envolvendo eletrofisiologia e microscopia eletrônica, foram realizados na década de 70 em junções neuromusculares de rã (Heuser & Reese, 1973; Ceccarelli *et al.*, 1973; Wilkinson & Cole, 2001, Rizzoli *et al.*, 2003). Heuser & Reese, 1973, demonstraram que estimulação de alta-frequência resulta na depleção vesicular e que a reciclagem de VS requer intermediário endocítico. Usando estimulação de baixa-frequência, Ceccarelli *et al.*, 1973, não encontraram depleção significativa de VS nem a necessidade de intermediário endocítico. Experimentos mais recentes na mesma preparação demonstraram que o estímulo que libera a população de reserva resulta em exocitose mais lenta que procede através da formação de invaginações, ao passo que, quando a população de reciclagem foi seletivamente liberada, nenhum intermediário foi observado (Richards *et al.*, 2000; 2003). As VS da população de reciclagem parecem ser endocitadas diretamente a partir da membrana plasmática, provavelmente através de mecanismo dependente da capa de clatrina (Rizzoli *et al.*, 2004). Concluindo, VS da população de reciclagem são geralmente recuperadas através da endocitose diretamente a partir da membrana plasmática, ao passo que a liberação da população de reserva é seguida pela “bulk” endocitose, ou endocitose por grandes invaginações da membrana plasmática (Richards *et al.*, 2000; 2003).

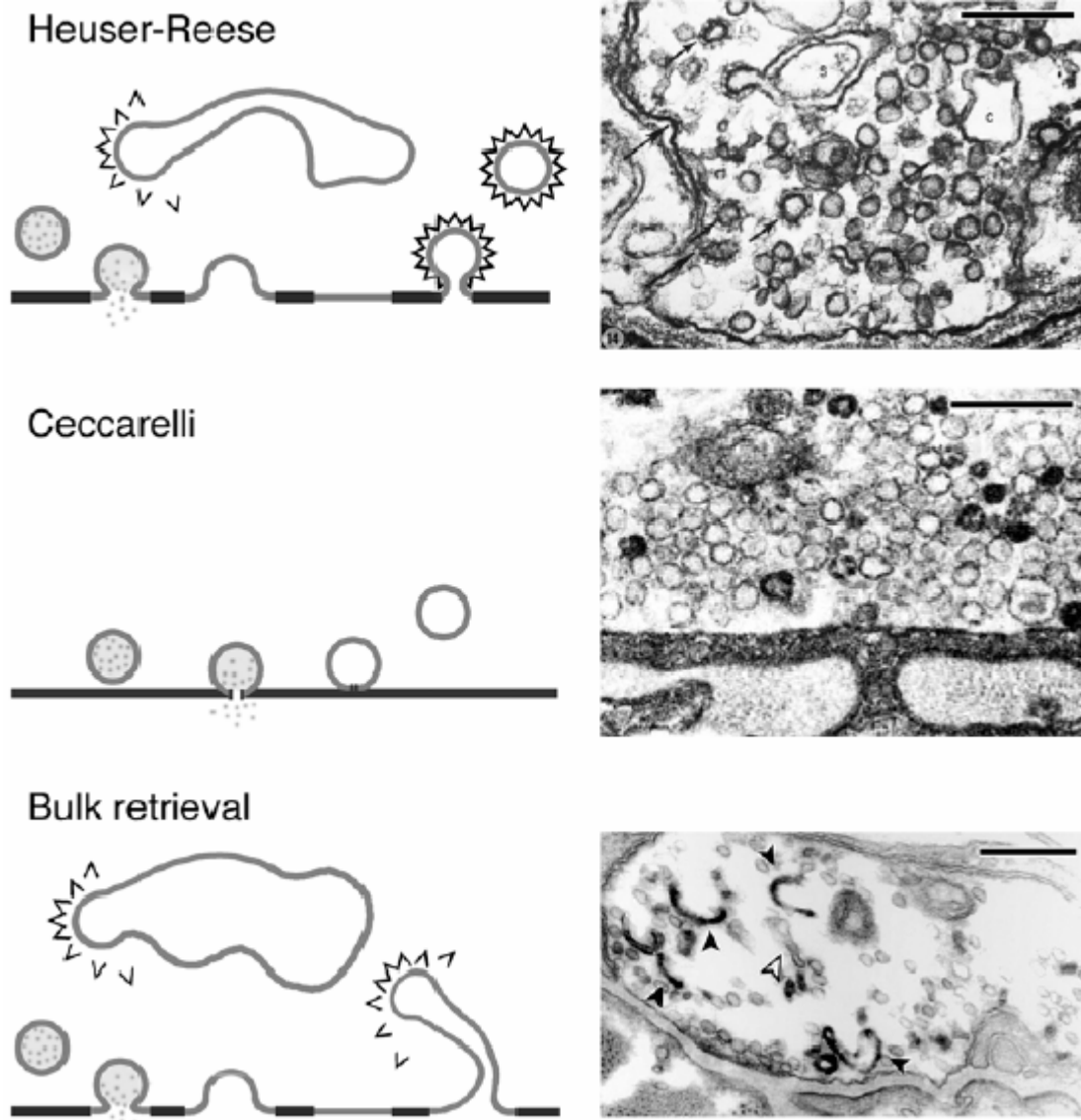


Figura 4: Modelos de endocitose de vesículas sinápticas em junção neuromuscular. **(Painel Superior)** Modelo de Heuser-Reese no qual as vesículas sinápticas são completamente integradas à membrana da zona ativa durante a exocitose e são recicladas por meio de endocitose mediada por capa de clatrina. Vesículas cobertas podem também brotar a partir de grandes cisternas (diagrama à esquerda). Micrografia eletrônica (à direita) demonstrando a presença de depressões de membrana e vesículas cobertas por capa de clatrina (setas) em terminal motor submetido a estímulo elétrico. É possível observar também a presença de cisternas (c). **(Painel médio)** Diagrama representando modelo de *kiss and run* (à esquerda) proposto por Ceccarelli no qual, durante a liberação de neurotransmissores, as vesículas abrem um poro de fusão transitório, mas não se fundem completamente a membrana pré-sináptica, sendo recicladas localmente. Micrografia eletrônica (à direita) de terminal motor submetido a estímulo elétrico de baixa frequência por duas horas. Destaca-se a ausência de vesículas cobertas por capa de clatrina e de cisternas. **(Painel inferior)** Diagrama representando endocitose via grandes invaginações de membrana (à esquerda) após liberação vesicular. Essas grandes invaginações ocorrem longe dos locais de fusão e sua formação parece não envolver clatrina diretamente, podendo ou não se destacar da membrana plasmática. Micrografia eletrônica (à direita) indicando invaginações de membrana contendo FM1-43 fotoconvertido (setas negras) ou desprovidas do marcador (seta clara) (adaptado de Royle & Lagnado, 2003).

1.3 – Neurotransmissão Colinérgica

Na junção neuromuscular, acetilcolina (ACh) é secretada pelo terminal nervoso em pacotes multimoleculares ou quanta, os quais induzem alterações elétricas mensuráveis na membrana pós-sináptica (Del Castillo & Katz, 1954). A maioria das evidências experimentais indica que o quanta de transmissor é estocado dentro de vesículas sinápticas e liberado através da exocitose após fusão da VS com o axolema (Heuser *et al.*, 1979; Ceccarelli *et al.*, 1980; Haimann *et al.*, 1985; Torri-Tarelli *et al.*, 1985). A síntese e liberação de ACh envolvem um ciclo de eventos (Figura 3). A ACh é primeiramente formada no citoplasma do terminal nervoso a partir da acetil coenzima A (acetil-CoA) e colina em uma reação catalisada pela enzima solúvel colina acetiltransferase (ChAT). Após sua síntese, a acetilcolina é armazenada no interior das vesículas graças a seu transportador vesicular dependente de energia, VACHT, uma proteína com 12 domínios transmembrana que usa o gradiente eletroquímico gerado por uma próton ATPase para trocar dois prótons por uma molécula de ACh (Nguyen *et al.*, 1998; Naguib *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2002). A ACh é armazenada em concentrações supersomóticas (aproximadamente 300mM) dentro do lúmen da VS, juntamente com adenosina trifosfato (ATP), proteoglicanos, íons H^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} . Cada VS contém aproximadamente 5000-10000 moléculas de ACh. A ACh contida em uma única vesícula é freqüentemente referida como “quantum” de transmissor. Algumas moléculas de ACh liberadas na fenda sináptica se ligam aos receptores nicotínicos de ACh (nAChRs) na membrana pós-sináptica, ao passo que o restante é rapidamente hidrolizado pela acetilcolinesterase, presente na fenda sináptica, em colina e acetato. A colina é recaptada para dentro do terminal por um sistema de captação de alta afinidade, tornando-se viável para a resíntese de ACh (Naguib *et al.*, 2002).

O armazenamento de ACh nas VS via VACHT depende da geração de um gradiente transmembrana de natureza eletroquímica composto por um componente químico (ΔpH) e um componente elétrico ($\Delta \Psi$) (Liu & Edwards, 1997; Rudnick, 1998). Esse gradiente é gerado *in situ* por bombas como as próton ATPases vacuolares (H^+ V-ATPases), as quais são responsáveis pela acidificação de organelas como as VS, deixando o seu lúmen positivo, sendo, portanto, eletrogênicas (Nishi & Forgac, 2002). Esta bomba de prótons contém duas subunidades: V_1 , onde ocorre a hidrólise do ATP e V_0 , onde está localizado o carregador de H^+ (Futai *et al.*, 2000). A H^+ V-ATPase bombeia prótons para dentro das VS para acidificá-las, atingindo um pH de 5.2-5.5 (Michaelson & Angel, 1980; Fuldner & Stadler, 1982). Dessa forma, os transportadores

vesiculares translocam neurotransmissores do citosol para o lúmen vesicular, usando a energia gerada pelo gradiente eletroquímico para transportar esses transmissores contra um gradiente de concentração (Maycox *et al.*, 1990; Gasnier, 2000). Sabe-se que o potencial eletroquímico gerado pela H^+ V-ATPase produz uma força suficiente para concentrar ACh nas VS próximo a 3000 vezes. Todavia, a ACh intravesicular é supostamente apenas 100 vezes mais concentrada do que ACh citossólica, sugerindo que o preenchimento vesicular de ACh não atinge um equilíbrio, aumentando a possibilidade de que mecanismos de impedimento possam funcionar no transporte vesicular de ACh (Parsons, 2000). As H^+ V-ATPases, por meio da hidrólise do ATP, translocam prótons H^+ para o interior das vesículas sinápticas, estabelecendo duas condições. Primeiramente, o pH no interior da vesícula torna-se mais ácido, gerando um gradiente químico de pH (ΔpH) através da membrana vesicular e em seguida, o interior da vesícula torna-se abundante em cargas positivas, criando um potencial elétrico transmembrana ($\Delta\Psi$). O somatório dessas duas condições corresponde ao gradiente eletroquímico, representado pela equação $\Delta\mu_{H^+} = \Delta pH + \Delta\Psi$ (revisado por Ozkan & Ueda, 1998). O VAcHT realiza, então, a troca de dois íons H^+ por uma molécula de acetilcolina, preenchendo o interior das vesículas com o neurotransmissor (Parsons *et al.*, 1993; revisado por Prado *et al.*, 2002). O gradiente de pH é a principal força que mantém o acúmulo de catecolaminas dentro de VS. Quando este gradiente é colapsado observa-se uma perda no conteúdo vesicular de catecolamina (Camacho *et al.*, 2006). A bioenergética do transporte vesicular de ACh se baseia predominantemente no componente químico (ΔpH) do gradiente próton-eletroquímico de membrana (Reimer *et al.*, 1998).

Além das H^+ V-ATPases, existem evidências de que canais para cloreto também se encontram inseridos na membrana da vesícula, sendo responsáveis pelo influxo de íons Cl^- (Stobrawa *et al.*, 2001; Jentsch *et al.*, 2002). Esta corrente de cloro seria importante para neutralizar as cargas positivas transportadas pela H^+ V-ATPase, uma vez que a neutralização dos prótons internalizados faz com que a H^+ V-ATPase tenha maior capacidade de transporte (Liu & Edwards, 1997; Jentsch *et al.*, 2002), reduzindo assim a influência do componente elétrico $\Delta\Psi$ na captação de acetilcolina, (Stobrawa *et al.*, 2001; Van der Kloot, 2003). Como consequência, as vesículas ficam mais acidificadas. Logo, o influxo de cloro para o interior de vesículas seria responsável por um aumento no ΔpH às custas do $\Delta\Psi$, aumentando assim a internalização desses neurotransmissores (Liu & Edwards, 1997; Jentsch *et al.*, 2002).

Há evidências de que o conteúdo vesicular pode ser também regulado por agonistas colinérgicos. Van Der Kloot, 1993, estudou o efeito de agonistas colinérgicos nicotínicos como carbacol, DMPP, ACh e citisina, no aumento do conteúdo vesicular em JNM de rã. Preparação controle banhada em solução de gluconato hipertônico apresentou aumento de quatro vezes nos MEPPs, ao passo que preparação contralateral banhada na mesma solução, porém acrescida de agonista, apresentou bloqueio do aumento do conteúdo vesicular de ACh, redução da liberação vesicular evocada observada pela diminuição da amplitude dos EPPs, redução das MEPCs e da frequência de MEPPs. Quando o conteúdo vesicular encontra-se elevado, os agonistas podem cessar a produção do quanta adicional. Ainda não se sabe como os sinais colinérgicos produzem esses efeitos. O receptor nicotínico de ACh parece estar envolvido na regulação do conteúdo e liberação vesicular, uma vez que este e seu agonista têm perfis farmacológicos similares, todavia o mecanismo pelo qual eles atuam ainda não foi totalmente elucidado (Van der Kloot, 1993).

No terminal motor de rã, a exocitose de neurotransmissor normalmente ocorre ao longo de fileiras duplas de largas partículas intramembranas que marcam o limite das zonas ativas (Heuser *et al.*, 1974; Heuser *et al.*, 1979; Ceccarelli *et al.*, 1979a,b). Essas partículas podem representar locais especializados para a fusão vesicular hipotetizado por Katz (1969) ou canais para cálcio, sendo que, neste caso, a fusão de VS com as zonas ativas seguem o influxo de íons cálcio nestes locais (Heuser *et al.*, 1974; Pumplin *et al.*, 1981).

Uma distribuição atípica de locais de fusão foi relatado em junções neuromusculares de rãs estimuladas com altas concentrações de cloreto de potássio (KCl) (20mM) por 15-60 min: sob estas condições, a fusão de vesículas não esteve preferencialmente localizada próximo as zonas ativas, mas estavam uniformemente distribuídas em todo terminal pré-sináptico (Ceccarelli *et al.*, 1979b). Foi sugerido que a despolarização prolongada pode ativar locais latentes para fusão vesicular (Ceccarelli *et al.*, 1979b), e que a exocitose induzida por potássio pode estar localizada próxima das zonas ativas em estágios mais precoces (Fesce *et al.*, 1982; Pecot-Dechavassine, 1982).

Embora o KCl tenha efeitos complexos na secreção de neurotransmissores (Gage & Quastel, 1965; Cooke & Quastel, 1973), concentrações elevadas deste íon são amplamente empregadas como substituto para o estímulo fisiológico para induzir secreção em uma variedade de sistemas neuronais. Parece que duas populações de locais de fusão para secreção de ACh são ativadas por altas concentrações de KCl em

diferentes cursos de tempo. Além do mais, locais de fusão nas zonas ativas, tradicionalmente implicadas na exocitose fisiológica, parecem sofrer inativação parcial com o tempo. Assim, altas concentrações de KCl mimetizam apenas inicialmente o padrão de secreção de transmissor induzido por potenciais de ação isolados, embora seus efeitos sejam também dependentes de Ca^{+2} e presumivelmente mediados pela despolarização da membrana pré-sináptica. Assim, a exocitose é inicialmente ativada e posteriormente inativada por altas concentrações de KCl nas zonas ativas, enquanto locais de fusão em toda membrana pré-sináptica são ativados lentamente (Cecarelli *et al.*, 1988).

Na JNM, a liberação de ACh contida dentro de uma única VS causa um potencial em miniatura no terminal (MEPP). Cada MEPP tem pequena amplitude (0.5-1mV), sendo normalmente insuficiente para causar potencial de placa (Katz, 1969). Um impulso nervoso causa a liberação de aproximadamente 20-200 quanta, dependendo das espécies, em frações de milisegundos. O potencial de placa do terminal é gerado pelo somatório elétrico de vários potenciais em miniatura, sincronizadamente descarregados a partir da zona ativa. O pico de amplitude de um potencial do terminal é 15-20mV (Naguib *et al.*, 2002).

1.4 – Monitoramento do Ciclo de Vesículas Sinápticas Utilizando o Marcador Fluorescente FM1-43

A introdução de sondas fluorescentes como marcadores endocíticos tornou possível monitorar a reciclagem de VS em preparações vivas (Lichtman *et al.*, 1985; Betz *et al.*, 1992). Sondas do tipo FM, particularmente o FM1-43, têm sido utilizadas extensivamente para o estudo da reciclagem de VS em terminais motores de rã (Rizzoli *et al.*, 2003). As preparações são usualmente banhadas em soluções contendo a sonda de interesse que marca membranas extracelulares. Sob estimulação nervosa, as vesículas se fundem com a membrana plasmática e durante a endocitose compensatória a membrana marcada com a sonda é internalizada. O excesso da sonda na solução extracelular é lavado e a membrana internalizada pode ser visualizada mensurando, portanto, a endocitose. Estimulação adicional na ausência da sonda no meio extracelular pode monitorar a liberação da sonda internalizada, a qual provê a mensuração da exocitose (Rizzoli *et al.*, 2003).

As sondas do tipo FM são moléculas anfipáticas, contendo caudas lipofílicas e grupos carregados positivamente (valência +2), ligados via pontes de ligação duplas. A extensão da cauda lipofílica determina a afinidade da sonda pelas membranas; sondas

com caudas maiores marcam a membrana mais intensamente e têm cinética de lavagem mais demorada (Betz *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 2000). O grupo carregado positivamente garante que a sonda não permeie as membranas, assim as sondas ficam seqüestradas em compartimentos ligados à membrana após endocitose. O número de pontes de dupla ligação determina as características espectrais da sonda. Sondas que possuem uma ligação dupla como FM1-43 e FM2-10 podem ser excitadas no espectro da fluoresceína, já o FM4-64, que apresenta três ligações duplas entre cabeça e cauda, é excitado no espectro da rodamina (Betz, *et al.*, 1996; Rizzoli *et al.*, 2003, Brumback *et al.*, 2004) (Figura 5).

As características descritas acima garantem às sondas da família FM algumas vantagens. Elas marcam as membranas de forma reversível e, pelo fato de não atravessá-las, garantem que as moléculas de sonda não escapem das vesículas internalizadas durante a endocitose (Rizzoli *et al.*, 2003). Essas sondas são 350 vezes mais fluorescentes em meio hidrofóbico (membrana celular) comparado com soluções aquosas (Henkel *et al.*, 1996; Betz *et al.*, 1996; Brumback *et al.*, 2004). Assim, durante exocitose, a sonda liberada das VS torna-se significativamente menos fluorescente. Uma outra vantagem das sondas do tipo FM é que elas podem ser fotoconvertidas e usadas como marcadores para estudos ultraestruturais (Henkel *et al.*, 1996). Henkel *et al.*, 1996, através de estudos de fotoconversão, comprovaram que o FM1-43 captado pela endocitose encontra-se realmente no interior de vesículas sinápticas e, através de um fluorímetro, a mensuração da quantidade da sonda no meio extracelular foi realizada, demonstrando que o FM1-43 é realmente liberado após estimulação, uma vez que a concentração da sonda no meio extracelular aumentou consideravelmente durante desmarcação do terminal nervoso (Henkel *et al.*, 1996).

Aplicando estas sondas durante uma janela definida de tempo, em combinação com protocolos de estimulação precisos, populações específicas de vesículas endocitadas podem ser marcadas e sua cinética de liberação pode ser mensurada sob subsequente estimulação (Holt & Jahn, 2004).

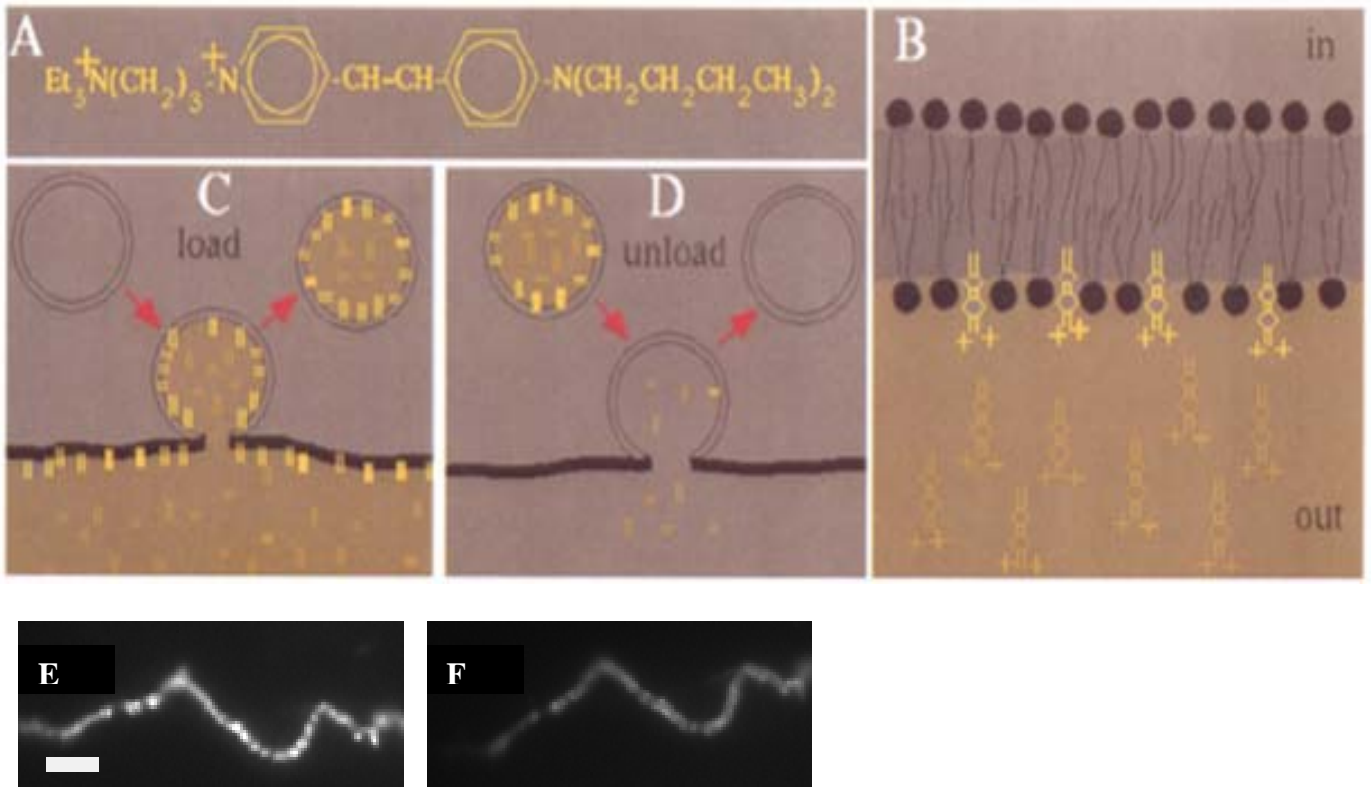


Figura 5: O marcador fluorescente FM1-43 é utilizado para monitoramento dos passos de endocitose e exocitose de vesículas sinápticas. (A) Estrutura do FM1-43. (B) A sonda dissolve-se na camada externa da membrana, mas não a penetra devido à sua divalência. (C e D) Típico experimento com a sonda FM1-43. (C) A sonda é adicionada à preparação. Quando a preparação é estimulada, as VS se fundem com a membrana plasmática permitindo a entrada da sonda (marcação). Após lavagem da sonda no meio, é coletada uma imagem através de microscópio de fluorescência. (D) Preparações são estimuladas na ausência da sonda (desmarcação); VS se fundem com a membrana, liberando a sonda. (Betz *et al.*, 1992). (E e F) Duas imagens representativas de um terminal nervoso motor de rã carregado com FM1-43 antes (E) e após 30 min de desmarcação com 60mM KCl (F). Escala=10µm

1.5 – Utilização de Drogas que Reduzem o Conteúdo Vesicular de ACh

A transmissão neuromuscular ocorre quando a ACh, que é liberada de terminais nervosos motores através da exocitose de VS, atravessa a fenda sináptica e ativa receptores nicotínicos pós-sinápticos. Cada VS normalmente contém e libera discreta quantidade de ACh, chamada quantum. O potencial pós-sináptico causado por um quantum de ACh é o potencial pós-sináptico em miniatura (MEPP). Dois mecanismos mantêm o suprimento de VS para a população de liberação rápida. Primeiro, as VS são mobilizadas do estoque principal durante estimulação contínua. Em seguida, após a exocitose, a membrana sináptica é recuperada rapidamente através da endocitose. A membrana vesicular recuperada deve se transformar em vesícula, ser repleta com

ACh e então retornar ao RRP próximo às zonas ativas. Espera-se que haja algum mecanismo para garantir que as VS sejam preenchidas, ao menos parcialmente, com transmissor, antes de fazer parte do RRP (Parsons *et al.*, 1999). Estudos eletrofisiológicos prévios indicam que VS, apesar de se encontrarem parcialmente preenchidas, sofrem exocitose normalmente (Elmqvist & Quastel, 1965; Searl *et al.*, 1990, 1991). Todavia, ainda não estava estabelecido se a exocitose continuaria ou seria interrompida, uma vez que as VS recicladas não continham transmissor. Assim, não se sabia se o preenchimento de VS era um pré-requisito para a exocitose de VS (revisado por Van der Kloot & Molgó, 1994).

Neste estudo, foram utilizadas drogas que depletam o conteúdo vesicular de ACh como vesamicol, NH_4Cl e metilamina, em preparações de JNM de rã, a fim de estudar a reciclagem de vesículas sinápticas vazias. O NH_4^+ inibe a captação de ACh para o interior das VS diminuindo o gradiente de próton através da membrana vesicular, que é necessário para acúmulo do transmissor (revisado por Parsons *et al.*, 1993; Van der Kloot & Molgó, 1994). Adicionando NH_4^+ a soluções hipertônicas ocorre inibição significativa do aumento do conteúdo vesicular, com redução dos MEPPs, sendo que, em um estudo de Van der Kloot, 1987, a maior diminuição encontrada foi de 25% do valor controle. Sabe-se que o tratamento com gluconato hipertônico aumenta o conteúdo vesicular em aproximadamente 4 vezes, então parece que o NH_4^+ pode quase completamente bloquear a adição de ACh ao quanta (Van der Kloot, 1987).

Reduções similares na amplitude dos MEPPs foram relatadas quando terminais nervosos motores de rã foram estimulados na presença de vesamicol, um inibidor da captação ativa de ACh para dentro de vesículas colinérgicas através da inibição do VAcHT (Van der Kloot, 1986; Whitton *et al.*, 1986; Lupa, 1988; Searl *et al.*, 1991; revisado por Van der Kloot & Molgó, 1994).

O aumento do conteúdo vesicular foi também inibido por metilamina e trimetilamina. Ambas agem reduzindo o gradiente de próton, formando espécies não carregadas que permeiam as membranas celulares (Van der Kloot, 1987). Metilamina, como uma base fraca permeável à membrana, é acumulada em compartimentos ácidos e em altas concentrações descarrega o gradiente de pH transvesicular (ΔpH), colapsando-o, sem afetar o potencial de membrana transvesicular, ($\Delta\Psi$) (Cousin & Nicholls, 1997). A metilamina inibe a acidificação de organelas intracelulares (Williamson & Neale, 1994; Gekle *et al.*, 1995; Lencer *et al.*, 1995) e a retenção de

neurotransmissores excitatórios de VS de células granulares é dependente da manutenção contínua de $\Delta\Psi$ e não do ΔpH (Cousin & Nicholls, 1997).

Como mencionado anteriormente, o FM1-43 se liga à camada externa da membrana plasmática, ganhando acesso ao lúmen da VS durante a endocitose, podendo ser liberado durante exocitose evocada (Betz *et al.*, 1992). O FM monitora o tráfego da membrana vesicular mesmo quando os conteúdos solúveis da vesícula estão alterados (Cousin & Nicholls, 1997), sendo, portanto, uma boa ferramenta para se estudar a reciclagem de vesículas sinápticas vazias, monitorando a exocitose/endocitose na ausência de transmissor.

Tendo em vista as alterações eletrofisiológicas induzidas pelo vesamicol, NH_4Cl e metilamina em diversos modelos experimentais, este trabalho descreve pela primeira vez o uso da sonda fluorescente FM1-43 no monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas em junção neuromuscular de rã submetidas ao tratamento com estas drogas. Essa nova abordagem permite estudar os efeitos destas sobre exocitose e endocitose em material não fixado, através de preparações *extra-vivo*, com obtenção de imagens que registram as alterações induzidas ou não pelas drogas.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

Investigar os efeitos de drogas que reduzem o conteúdo vesicular de acetilcolina como vesamicol, Cloreto de amônio e metilamina sobre o ciclo de vesículas sinápticas em junção neuromuscular de rã utilizando o marcador fluorescente FM1-43.

2.2 - Objetivos Específicos

- Investigar as implicações da administração de vesamicol, Cloreto de amônio e metilamina sobre a exocitose de vesículas sinápticas evocada por estímulo despolarizante em junção neuromuscular de rã.
- Investigar as implicações da administração de vesamicol, Cloreto de amônio e metilamina sobre a endocitose compensatória em junção neuromuscular de rã em comparação com a endocitose de vesículas sinápticas com conteúdo vesicular preservado.
- Testar a eficácia das drogas utilizadas em junção neuromuscular de rã em outro modelo experimental.

3 - Materiais e Métodos

3.1 – Isolamento da Preparação de Junção Neuromuscular de Rã

Durante o desenvolvimento embrionário, axônios motores estão geralmente presentes no músculo quando os mioblastos se fundem para formar fibras musculares. A junção neuromuscular (JNM) se forma imediatamente e em abundância, uma vez que as fibras musculares tornam-se inervadas por axônio de um motoneurônio, formando uma unidade motora. Células de Schwann e a expressão de canais iônicos no sarcolema desempenham papéis importantes no desenvolvimento de JNM. Rãs apresentam vantagens particulares como preparações experimentais elegantes para o estudo do desenvolvimento da plasticidade em JNM. Primeiramente porque há muitas informações disponíveis. Segundo, porque todo estágio do desenvolvimento é rapidamente avaliável e acessível. Terceiro, pelo largo tamanho da JNM da rã (em adultos, são de 5-50 vezes maior do que em camundongos), facilitando observações anatômicas e certas micromanipulações. E também pela grande remodelagem sináptica, existência de múltiplas JNM ao longo das fibras musculares e finalmente, por terem algumas características diferentes das JNM dos mamíferos, as JNM de rãs provêm oportunidades para testar a universalidade de hipóteses derivadas do trabalho em JNM de mamíferos (Herrera & Zeng, 2003).

O músculo cutâneo peitoral de rã (*Rana catesbeiana*), associado ao fragmento de nervo responsável pela sua inervação, era dissecado de animais pesando entre 60 e 80g. O conjunto músculo-nervo era montado em placa contendo o fundo coberto por gel de silicone Sylgard® e fixado com alfinetes entomológicos. Mantinha-se a preparação em solução Ringer contendo 115mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 1,8mM de CaCl₂ e 5mM de Hepes. Acertava-se o pH do meio em 7.2 utilizando-se solução de NaOH 1N.

3.2 – Marcação de Vesículas Sinápticas com FM1-43

Para marcação das vesículas sinápticas, utilizou-se o marcador fluorescente FM1-43 (Molecular Probes TM) na concentração de 5µM em adição à solução despolarizante (60mM KCl), durante 10 minutos. Após a estimulação, a preparação era mantida em repouso por 15 minutos em meio Ringer normal contendo FM1-43 em adição a solução salina para garantir captação do marcador durante endocitose compensatória. Em seguida, a preparação era lavada em solução salina desprovida de FM no mínimo por uma hora para que o excesso de marcador associado à membrana

das fibras musculares fosse removido, permitindo melhor visualização dos agrupamentos vesiculares contendo FM1-43 ao longo das terminações axonais.

3.3 - Análise dos Efeitos do Vesamicol, Cloreto de amônio e Metilamina sobre Endocitose

Preparações de junção neuromuscular de rã foram incubadas em meio normal contendo 2 μ M vesamicol ou 30mM Cloreto de amônio ou 10M metilamina durante 20, 60 ou 30 minutos, respectivamente. Após este período, as preparações eram incubadas em solução despolarizante contendo FM1-43 por 10 minutos. Em seguida, as preparações eram mantidas em repouso por 15 minutos em meio Ringer normal na presença da droga e de FM1-43 para permitir endocitose compensatória. Após este tempo era feita a lavagem em meio normal, na presença da droga por uma hora e em seguida as imagens eram coletadas.

3.4 - Análise dos Efeitos do Vesamicol, Cloreto de amônio e Metilamina sobre Exocitose Evocada

Terminações motoras marcadas com FM1-43 na presença de 2 μ M vesamicol ou 30mM Cloreto de amônio ou 10M metilamina eram visualizadas em microscópio de fluorescência. Após obtenção de imagens, foi realizado aplicação de solução despolarizante (60mM KCl) na presença da droga. Imagens das terminações eram novamente obtidas em intervalos de 5 minutos até que se completassem 30 minutos de tratamento com a droga em questão.

3.5 – Obtenção e Análise de Imagens

As imagens dos terminais nervosos marcados com FM1-43 eram obtidas com um microscópio de fluorescência (Zeiss Axioskop ®) acoplado a uma câmera de CCD (charged-coupled device) Micromax refrigerada (-20°C) utilizando-se objetivas de imersão em água (40x com abertura numérica de 0,75). As imagens coletadas pela câmera eram processadas e visualizadas em microcomputador utilizando-se o programa Axon Image Workbench. A luz utilizada para iluminar a preparação provinha de uma lâmpada de mercúrio e passava por filtros de 505/530nm para seleção do espectro da fluoresceína, adequado à excitação do marcador FM1-43. Todas as variáveis de ajuste da imagem como, por exemplo, tempo de exposição e *binning* eram mantidas constantes para imagens obtidas num mesmo experimento.

A análise das imagens e a mensuração dos níveis de fluorescência foram realizadas utilizando-se os programas Metamorph 4.0 e Microsoft Excel. Os dados obtidos eram normalizados percentualmente e convertidos em representações gráficas

através do programa Sigma Plot 9.0. A análise estatística era realizada pela aplicação do teste *t-student* pareado.

3.6 - Determinação da Liberação de [³H]-ACh em Fatias de Córtex Cerebral de Ratos

3.6.1 Obtenção das Fatias do Córtex Cerebral

Foram utilizados ratos albinos da raça Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 180 a 220 gramas fornecidos pelo CEBIO (centro de bioterismo) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Após decaptação, cérebro foi removido e o córtex dissecado em gelo, sobre placa Petri coberta por papel de filtro umedecido com solução (meio de incubação). Em seguida, o córtex foi fatiado em fatias de 0,4mm no fatiador de tecido Mc ILWAIN da BRINKMANN INSTRUMENTS, USA.

O tecido foi pesado em balança de torção na quantidade de 40 mg e colocado em frascos de incubação que se encontravam em gelo. Esses frascos continham 1,0ml de meio de incubação.

O meio de incubação consiste em 136mM NaCl; 2,7mM KCl; 1,8mM CaCl₂; 5,5mM Glicose; 10mM TRIS; 20μM Paraoxan. O pH final é ajustado em 7,4 com HCl 0,1N.

3.6.2 Marcação das Fatias com [³H]ACh

As fatias obtidas eram colocadas em banho com agitação (120rpm), pré-incubadas a 37°C durante 5 min e posteriormente estimuladas por 15 min com 50mM de KCl (1,0ml de 100mM de KCl por frasco de incubação) com o objetivo de se depletar os estoques intracelulares de ACh. As fatias eram retiradas do banho e transferidas para tubos de centrífuga que já se encontravam em gelo e logo após centrifugadas (6000g durante 5 min, a 4°C.). Em seguida, os sobrenadantes eram desprezados e os tecidos ressuspendidos com 1ml de meio de incubação na ausência ou presença de 4μM vesamicol, 60mM NH₄Cl ou 20M metilamina. Nessa etapa, a concentração das drogas utilizadas correspondia ao dobro da concentração final. As alíquotas eram transferidas para frascos de incubação que se encontravam no gelo. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho com agitação (120rpm), pré-incubadas a 37°C, durante 5 min e posteriormente incubadas por 30 min para que as drogas testadas ocupassem seus respectivos alvos de ação. Após esse período, foi acrescentado aos frascos 1ml de meio de incubação contendo colina radioativa (³H-colina), concentração final de 0,11μCi/ml, seguindo um período de incubação de 30 min. Após a marcação, as fatias foram transferidas para tubos de centrífuga que já se encontravam em gelo e logo após foram

centrifugadas (6000g durante 5 min, a 4°C).

3.6.3 Lavagem das Fatias com Colina Fria

Os tubos eram retirados da centrífuga, o sobrenadante era desprezado as fatias ressuspensas com 2,0ml de meio de incubação contendo colina (1 μ M a 4°C) na presença ou ausência das drogas testadas (2 μ M vesamicol, 30mM NH₄Cl ou 10M metilamina). As amostras eram novamente centrifugadas. Essa etapa de lavagem das fatias era realizada por duas vezes. O procedimento é realizado com o objetivo de se remover a ³H-colina que se encontrava inespecificamente ligada ao tecido e que não foi captada pelo terminal nervoso.

3.6.4 Estimulação das Fatias

Após a lavagem das fatias com colina fria, estas foram centrifugadas e o sobrenadante desprezado. As fatias eram transferidas para frascos de vidro contendo 1,0ml de solução (meio de incubação) na presença ou ausência das respectivas drogas (com o dobro da concentração final), colocadas em banho com agitação (120rpm) à temperatura de 37°C e pré-incubada por 5 min. Em seguida, as fatias eram estimuladas por 15 min com 50mM de KCl (1,0ml de 100mM de KCl por frasco de incubação). Nas amostras que correspondiam ao controle, foram adicionados 1ml de meio de incubação (com 2,7mM de KCl) e as fatias foram então incubadas por 15 min, para se obter a liberação de acetilcolina não evocada por KCl.

3.6.5 Contagem da Radioatividade do Sobrenadante

Ao terminar o tempo de incubação, os frascos eram retirados do banho e o material transferido em seguida para um tubo de centrífuga. Após a centrifugação (6000g por 5 min, a 4°C) o sobrenadante era colocado em tubo de ensaio e 100 μ L desta solução era transferido para um microtubo (eppendorf) contendo 1000 μ L de solução de Bray. A radioatividade foi contada no espectrofotômetro de cintilação líquida durante 10 min.

3.6.6 Análise Estatística dos Resultados

Os resultados foram obtidos e analisados em DPM de [³H]-ACh / mg de tecido. Representam as médias das amostras, feitas em triplicata, repetidas no mínimo três vezes (em dias diferentes), \pm o erro padrão da média (EPM).

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA), considerando $p < 0,05$ estatisticamente significativo. A quantificação e a análise estatística dos resultados foram realizadas utilizando o programa Sigma-plot (Scientific Graphing Software), versão 8.0 e GIPIS versão 2001. Para o cálculo do EC₅₀ também

foi usado o Sigma-plot versão 8.0.

4 - Resultados

4.1 - Marcação dos Aglomerados Vesiculares com FM1-43

Terminações motoras foram marcadas por meio da aplicação de estímulo despolarizante (60mM KCl, 10min), sobre o músculo peitoral cutâneo de rã em meio contendo FM1-43 (5 μ M). As terminações axonais marcadas, visualizadas em microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera de CCD, apresentavam um padrão característico com presença de pontos fluorescentes enfileirados ao longo da terminação, assemelhando-se a um colar de pérolas (Figura 6A, 7A, 8A). Cada ponto fluorescente representava aglomerados de vesículas sinápticas contendo FM1-43 em seu interior, sendo que o marcador foi captado durante a endocitose compensatória após liberação vesicular induzida pelo estímulo despolarizante. Portanto, cada ponto fluorescente indicava local de contato sináptico ao longo da terminação axonal.

Diante disso, foram realizados experimentos com intuito de se investigar quais as implicações do vesamicol (Figura 6), Cloreto de amônio (Figura 7) e metilamina (Figura 8) sobre a endocitose e captação de FM1-43.

4.1.1- Marcação dos Aglomerados Vesiculares na Presença de Vesamicol:

Dados na literatura sugerem que VS de terminais nervosos tratados com vesamicol, inibidor reversível, não-competitivo do transportador vesicular de ACh, sofrem ciclos normais de endocitose e exocitose (Parsons *et al.*, 1999). As preparações foram então incubadas durante 20 min em meio contendo 2 μ M de vesamicol e 5 μ M de FM1-43. Após este período, as preparações foram marcadas por meio da aplicação de estímulo despolarizante (60mM KCl, 10 min) na presença de FM1-43 e vesamicol e examinadas posteriormente ao microscópio de fluorescência. As imagens obtidas mostraram terminações axonais marcadas, com padrão de pontuação típico, semelhante ao controle, indicando que o vesamicol não bloqueia a endocitose e a conseqüente captação de FM1-43 (Figura 6B). A Figura 6C mostra a quantificação de vários experimentos independentes e observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na intensidade da fluorescência dos terminais marcados na ausência ou na presença de vesamicol.

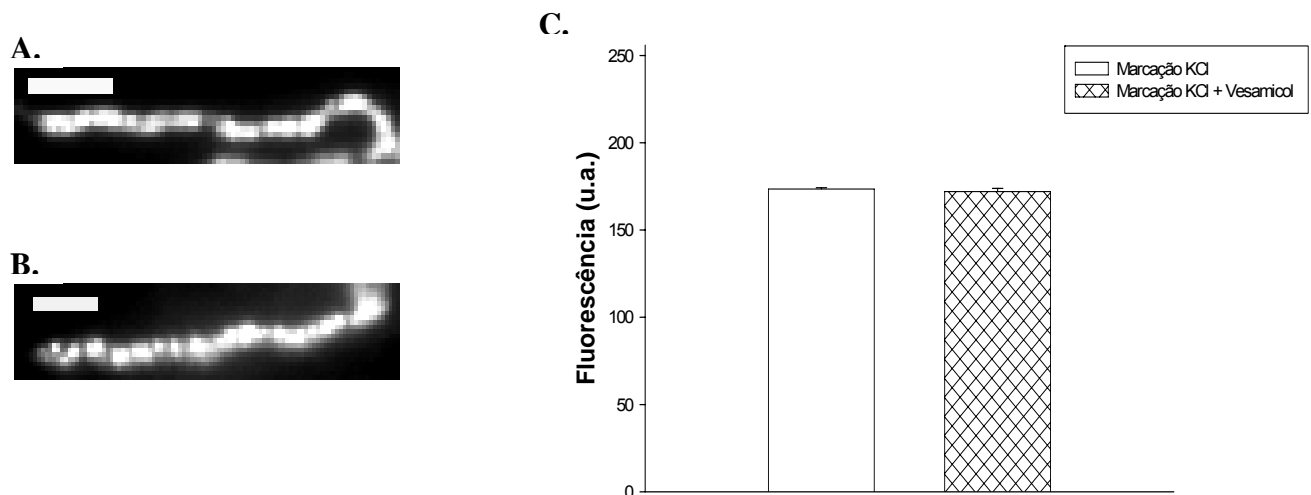


Figura 6: Vesamicol não interfere com a internalização do FM1-43. **(A)** Imagem de uma terminação motora representativa marcada com FM1-43 em solução Ringer contendo 60mM KCl. **(B)** Terminação axonal incubada com vesamicol a 2µM na presença de FM1-43 a 5µM durante 20min e marcada posteriormente com estímulo despolarizante na presença de vesamicol. Pode-se observar o aspecto de “colar de pérolas”, típico de junção neuromuscular de anfíbio. **(C)** Quantificação dos experimentos realizados nas condições controle e na presença de vesamicol. Analisados em A 126 terminações axonais, 210 spots; em B 61 terminações, 102 spots. Valor $P=0.3944657641$ (Barra de escala para todas as imagens: 10µm).

4.1.2- Marcação dos Aglomerados Vesiculares na Presença de Cloreto de amônio:

Na literatura existem dados demonstrando que a redução do pH no interior dos terminais pré-sinápticos em junção neuromuscular de lagarto determina inibição da endocitose e, por conseguinte, impede captação de FM1-43 (Lindgren, *et al.*, 1997). Para investigar ação do NH_4Cl na endocitose e captação de FM1-43, os músculos foram pré-incubados durante 60min em meio contendo 30mM de NH_4Cl , composto que tampona íons H^+ e neutraliza a acidez no interior do terminal pré-sináptico, e então submetidos à estimulação por estímulo despolarizante (60mM KCl por 10min) na presença de 5µM FM1-43 e 30mM NH_4Cl . As imagens obtidas mostraram terminações axonais marcadas, com pontos fluorescentes típicos (Figura 7B), e que a intensidade da marcação com a sonda foi semelhante tanto na presença quanto na ausência de NH_4Cl (Figura 7C). Esses resultados sugerem que o aumento no pH intravesicular não interfere na internalização do FM1-43.

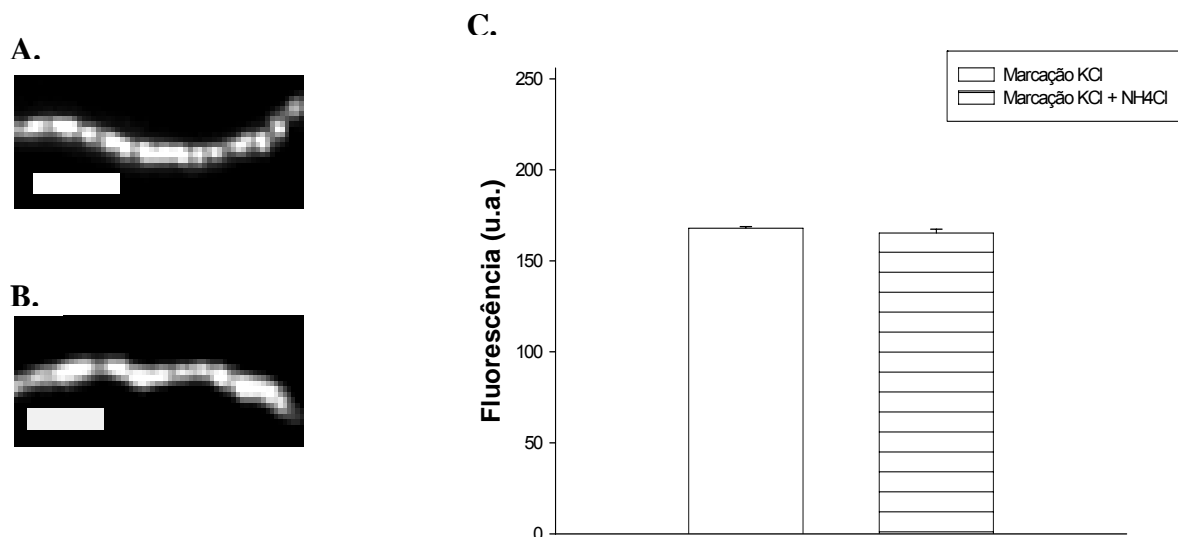


Figura 7: NH_4Cl não interfere com a internalização do FM1-43. **(A)** Imagem de terminação motora marcada com FM1-43 em solução Ringer contendo 60mM KCl. **(B)** Terminações axonais incubadas com NH_4Cl a 30mM na presença de FM1-43 a $5\mu\text{M}$ durante 60min e marcadas posteriormente com estímulo despolarizante na presença de NH_4Cl . Pode-se observar o aspecto de “colar de pérolas”, típico de junção neuromuscular de anfíbio. **(C)** Quantificação dos experimentos realizados nas condições controle e na presença de NH_4Cl . Analisados em A 56 terminações axonais, 128 spots; em B 48 terminações, 87 spots. Valor $P= 0.1701974802$ (Barra de escala para todas as imagens: $10\mu\text{m}$).

4.1.3- Marcação dos Aglomerados Vesiculares na Presença de Metilamina:

Dados na literatura sugerem que o aumento do conteúdo vesicular é inibido por metilamina e trimetilamina. Ambas agem reduzindo o gradiente de próton, formando espécies não carregadas que permeiam as membranas celulares (Van der Kloot, 1987). Preparações foram então incubadas durante 30min em meio contendo 10M de metilamina e $5\mu\text{M}$ de FM1-43. Após este período, as preparações foram marcadas por meio da aplicação de estímulo despolarizante (60mM KCl, 10min), também na presença de FM1-43 e metilamina e examinadas posteriormente ao microscópio de fluorescência. As imagens obtidas mostraram terminações axonais marcadas, com padrão de pontuação típico, semelhante ao controle, indicando que a metilamina não bloqueia a endocitose e a conseqüente captação de FM1-43 (Figuras 8B e 8C).

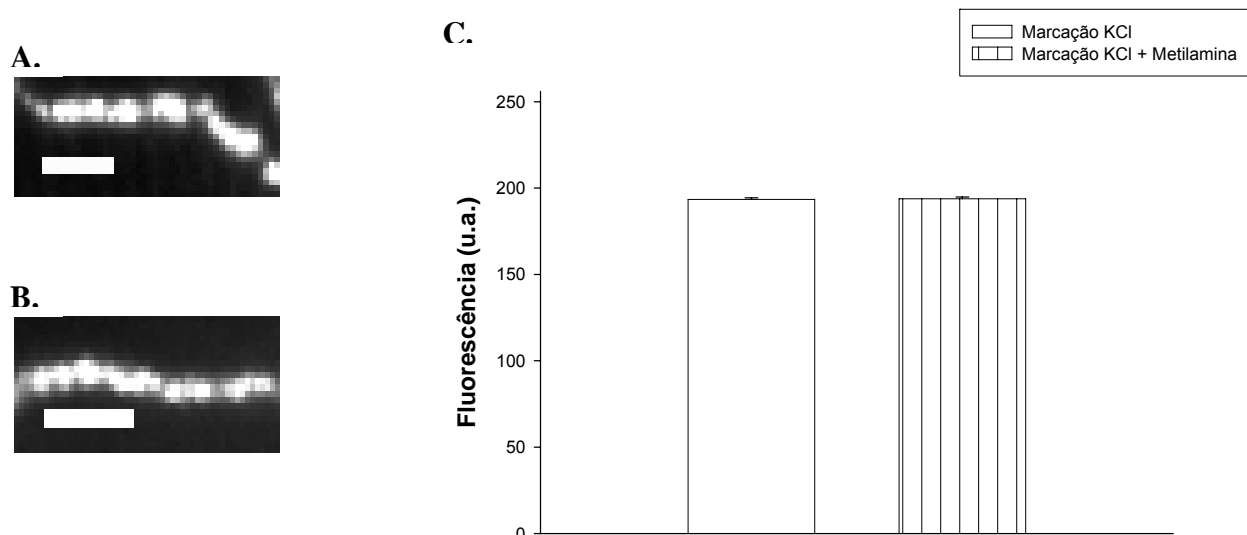


Figura 8: Metilamina não interfere com a internalização do FM1-43. **(A)** Imagem de terminação motora marcada com FM1-43 em solução Ringer contendo 60mM KCl. **(B)** Terminações axonais incubadas com metilamina a 10M na presença de FM1-43 a 5µM durante 30min e marcadas posteriormente com estímulo despolarizante na presença de metilamina. Pode-se observar o aspecto de “colar de pérolas”, típico de junção neuromuscular de anfíbio. **(C)** Quantificação dos experimentos realizados nas condições controle e na presença de metilamina. Analisados em A 39 terminações axonais, 264 spots; em B 23 terminações, 250 spots. Valor $P= 0.7135323185$ (Barra de escala para todas as imagens: 10µm).

4.2- Desmarcação dos Aglomerados Vesiculares

Considerando os resultados obtidos mostrando que vesamicol, NH_4Cl e metilamina não interferiram com a endocitose de vesículas sinápticas marcadas com FM1-43, investigou-se se essas drogas interferiram com a exocitose.

4.2.1- Fotodesmarcação:

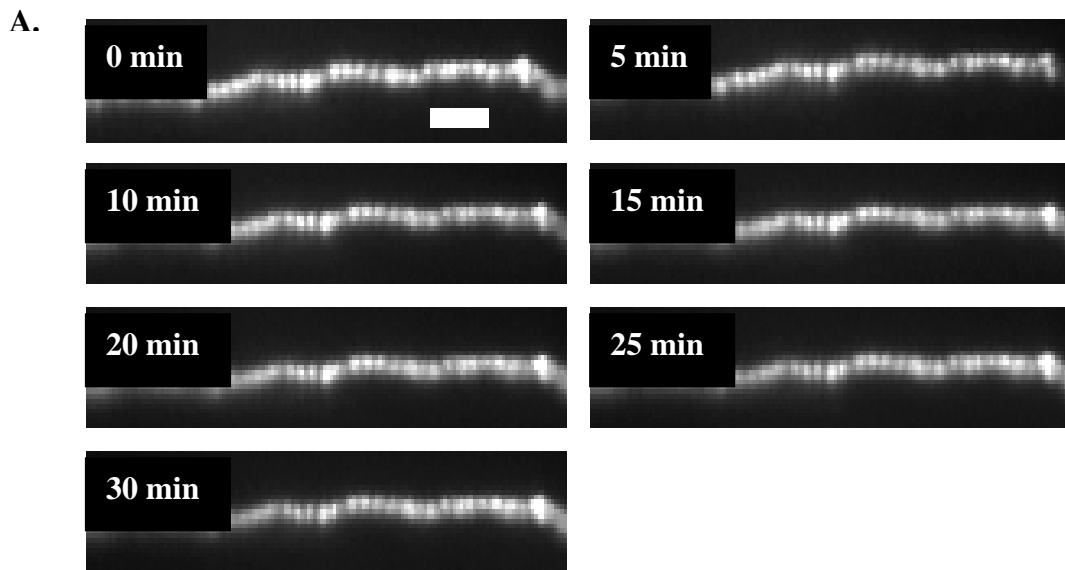
O FM1-43, se exposto prolongadamente à luz polarizada, apresenta redução na intensidade do sinal fluorescente, fenômeno conhecido como *fotodesmarcação* (*photobleaching*). Para mensuração dos níveis de *fotodesmarcação*, terminações marcadas com FM1-43 foram submetidas à luz polarizada em intervalos de tempo de 5min ao longo de 30min de experimento, sendo o tempo de exposição equivalente ao tempo de obtenção das imagens. Ao final de 30min, as terminações marcadas sofriam uma redução de aproximadamente 20% na intensidade do sinal fluorescente (Figura 9A e 10A) e 8% (Figura 11A).

4.2.2- Vesamicol não Interfere na Liberação Vesicular Evocada por Solução Despolarizante

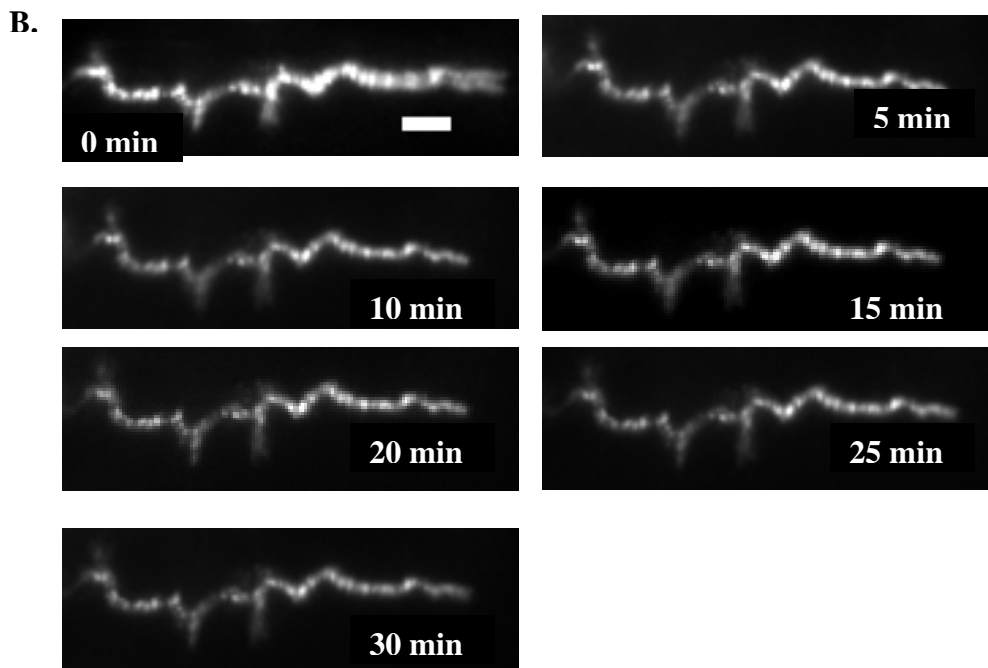
Para análise dos efeitos do vesamicol na exocitose em junção neuromuscular de rã, terminações marcadas com FM1-43 na presença da droga foram incubadas em solução Ringer com 60mM KCl contendo vesamicol a 2 μ M. Após 30min de tratamento, houve desmarcação dos pontos fluorescentes, indicando ocorrência de liberação vesicular com conseqüente extrusão do FM1-43 para o meio (Figura 9C). Foi realizado experimento controle, na ausência da droga, no músculo contralateral seguindo os mesmos parâmetros de 9C a fim de comparar resultados obtidos (Figura 9B).

Análise estatística demonstrou que a queda de fluorescência após tratamento com 2 μ M de vesamicol é significativa em relação à *fotodesmarcação*, confirmando a ocorrência de exocitose evocada pelo estímulo despolarizante na presença de vesamicol (Figura 9C). Como podemos observar na Figura 9D, não houve diferença estatisticamente significativa entre a desmarcação da preparação banhada em solução Ringer com 60mM KCl na ausência ou presença de 2 μ M vesamicol.

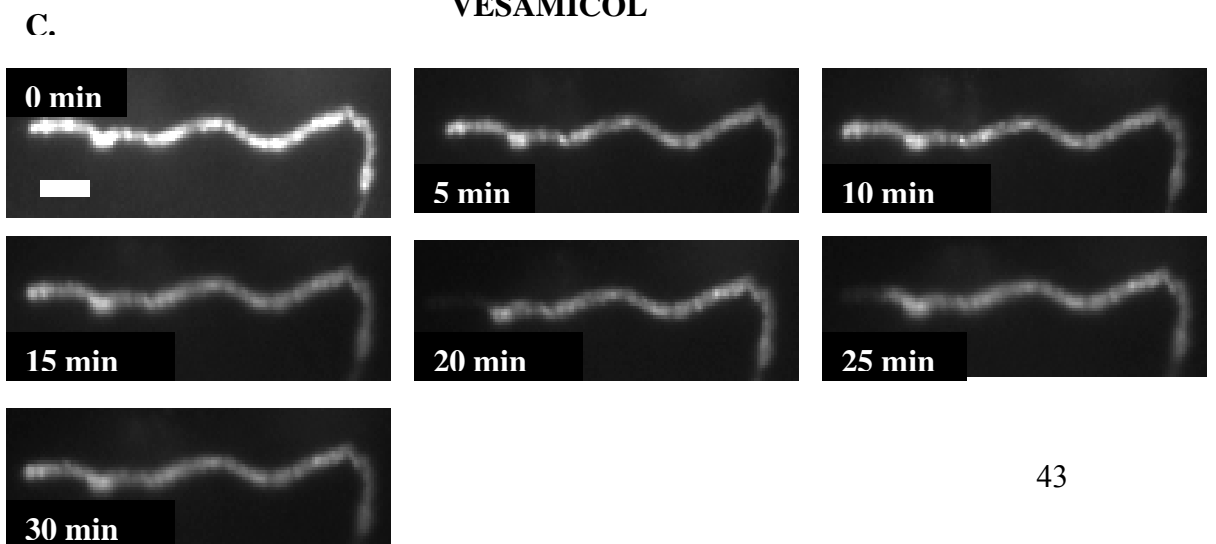
FOTODESMARCAÇÃO



CONTROLE



VESAMICOL



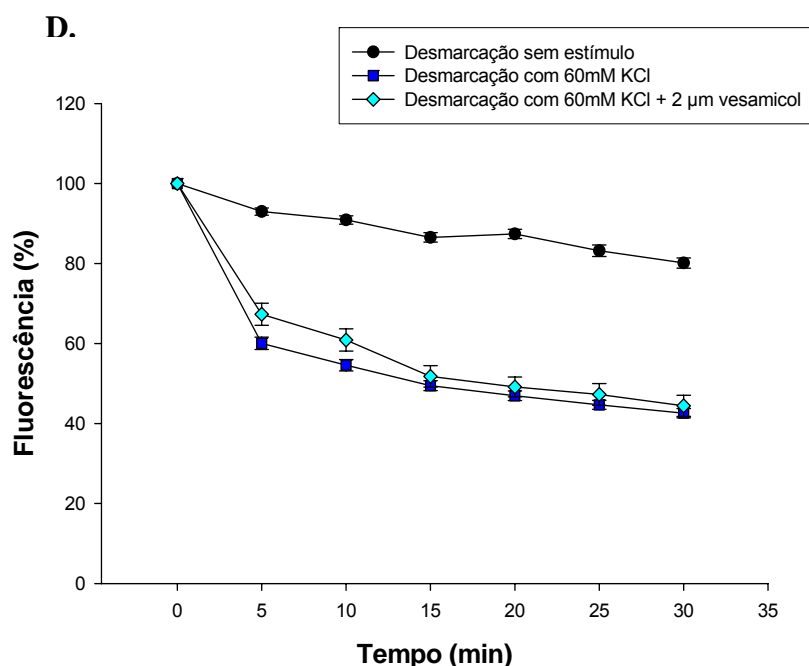


Figura 9: Vesamicol não interfere na liberação vesicular evocada por KCl, havendo conseqüente desmarcação de terminações axonais contendo FM1-43. **(A)** Terminal axonal durante 30min de experimento com exposições à luz polarizada em intervalos de 5min para coleta de imagens. Redução do sinal fluorescente representa desmarcação sem estímulo (*fotodesmarcação*) por iluminação repetida da preparação. **(B)** Terminação marcada com FM1-43 na ausência da droga durante 30min de experimento em meio contendo 60mM KCl, com exposições à luz polarizada em intervalos de 5min para coleta de imagens. Desmarcação indica exocitose evocada pelo estímulo despolarizante. **(C)** Terminação axonal marcada com FM1-43 na presença de 2μM vesamicol durante 30min de experimento em meio contendo 60mM KCl, além da droga, com exposições à luz polarizada em intervalos de 5min para coleta de imagens. Desmarcação indica exocitose evocada pelo estímulo despolarizante na presença da droga. **(D)** Gráfico demonstrando que a exocitose evocada pelo estímulo despolarizante na ausência de vesamicol é semelhante a desmarcação realizada na presença da droga. Ao final de 30min, a desmarcação induzida na presença e ausência da droga é significativa em relação a *fotodesmarcação* ($P < 0,05$). Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa entre desmarcação com KCl sozinho ou associado ao vesamicol. ($P = 0,4869610707$). Fotodesmarcação: representação de 4 experimentos, 22 spots; Controle: representação de 8 experimentos, 62 spots; Vesamicol: representação de 5 experimentos, 33 spots. (Barra de escala de 10μm representando o erro padrão).

4.2.2- NH_4Cl não Interfere na Liberação Vesicular Evocada por Solução Despolarizante

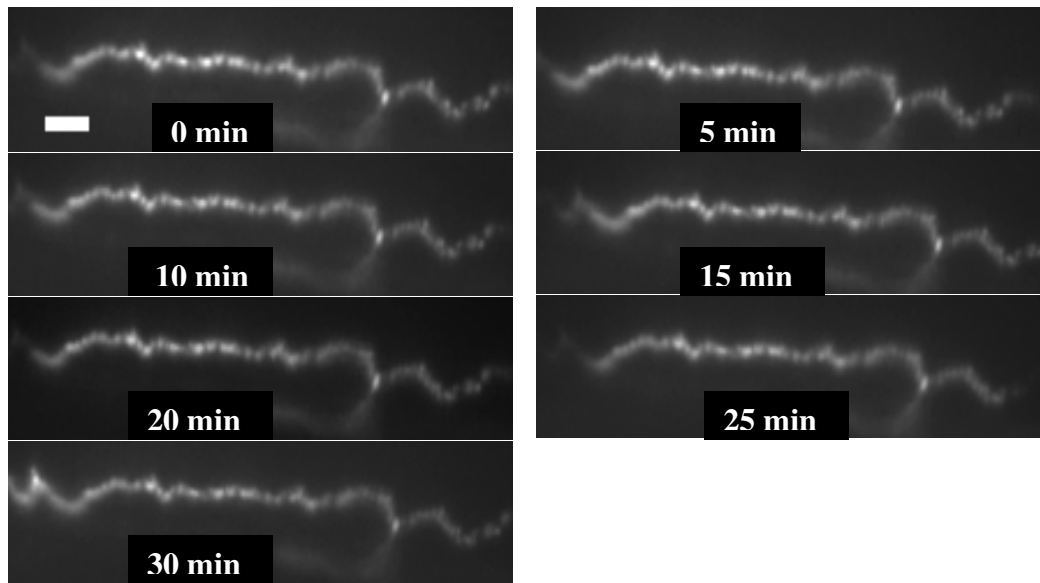
Para análise dos efeitos do NH_4Cl na exocitose em junção neuromuscular de rã, terminações marcadas com FM1-43 na presença da droga foram incubadas em solução Ringer com 60mM KCl contendo NH_4Cl a 30mM. Após 30min de tratamento, houve

desmarcação dos pontos fluorescentes, indicando ocorrência de liberação vesicular com conseqüente extrusão do FM1-43 para o meio (Figuras 10C). Foi realizado experimento controle, na ausência da droga, no músculo contralateral seguindo os mesmos parâmetros de 10C a fim de comparar resultados obtidos (Figura 10B).

Análise estatística demonstrou que a queda de fluorescência após tratamento com 30mM de NH_4Cl é significativa em relação a *fotodesmarcação*, confirmando a ocorrência de exocitose evocada por KCl na presença de NH_4Cl (Figura 10C). Como podemos observar na Figura 10D, não houve diferença estatisticamente significativa entre a desmarcação da preparação banhada em solução Ringer com 60mM KCl na ausência ou presença de 30mM NH_4Cl .

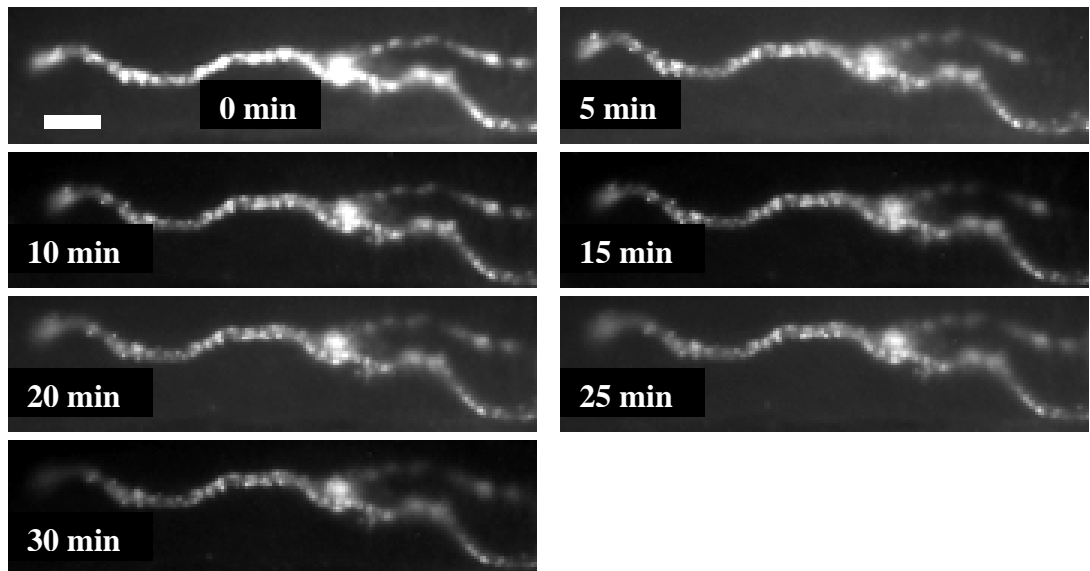
FOTODESMARCAÇÃO

A.



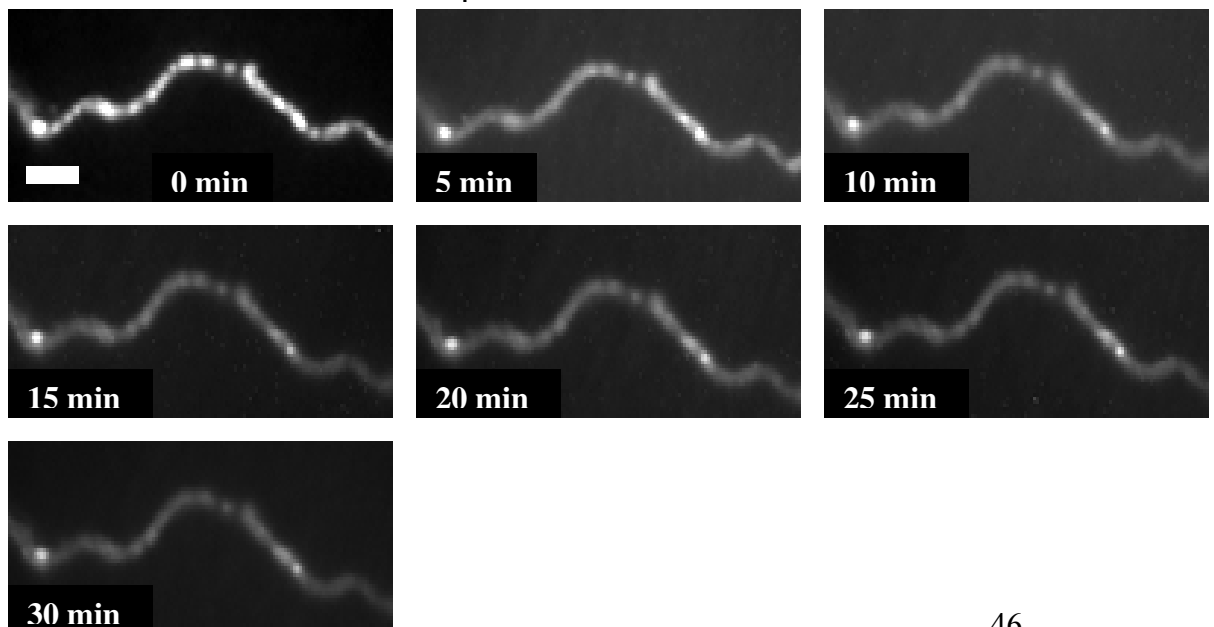
CONTROLE

B.



NH₄Cl

C.



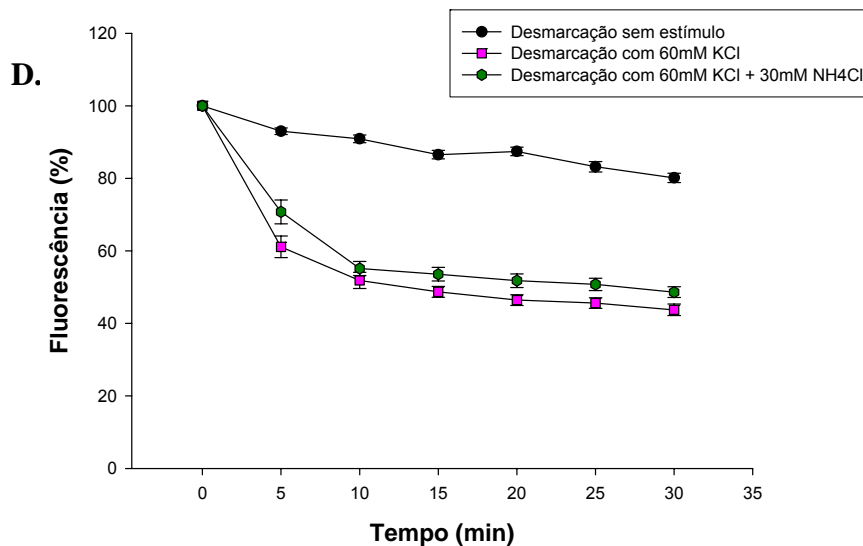


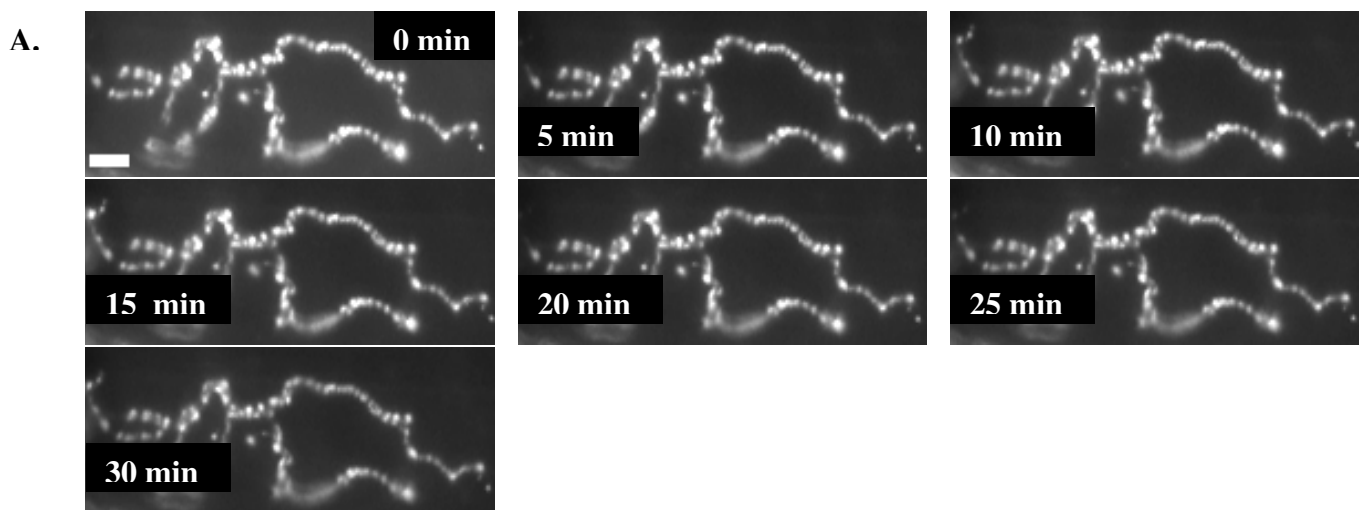
Figura 10: NH_4Cl não interfere na liberação vesicular evocada por KCl, havendo conseqüente desmarcação de terminações axonais contendo FM1-43. (A) Terminal axonal durante 30min de desmarcação de terminações axonais contendo FM1-43. (B) Terminal axonal durante 30min de desmarcação de terminações axonais contendo FM1-43. (C) Terminal axonal durante 30min de desmarcação de terminações axonais contendo FM1-43. (D) Gráfico demonstrando que a exocitose evocada pelo estímulo despolarizante na ausência de NH_4Cl é semelhante a desmarcação realizada na presença da droga. Ao final de 30min, a desmarcação induzida na presença e ausência da droga é significativa em relação a *fotodesmarcação* ($P < 0,05$). Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa entre desmarcação com KCl sozinho ou associado ao NH_4Cl . ($P = 0,3411487117$). Fotodesmarcação: representação de 4 experimentos, 22 spots; Controle: representação de 3 experimentos, 39 spots; NH_4Cl : representação de 7 experimentos, 51 spots. (Barra de escala de $10\mu\text{m}$ representando o erro padrão).

4.2.3- Metilamina não Interfere na Liberação Vesicular Evocada por Solução Despolarizante

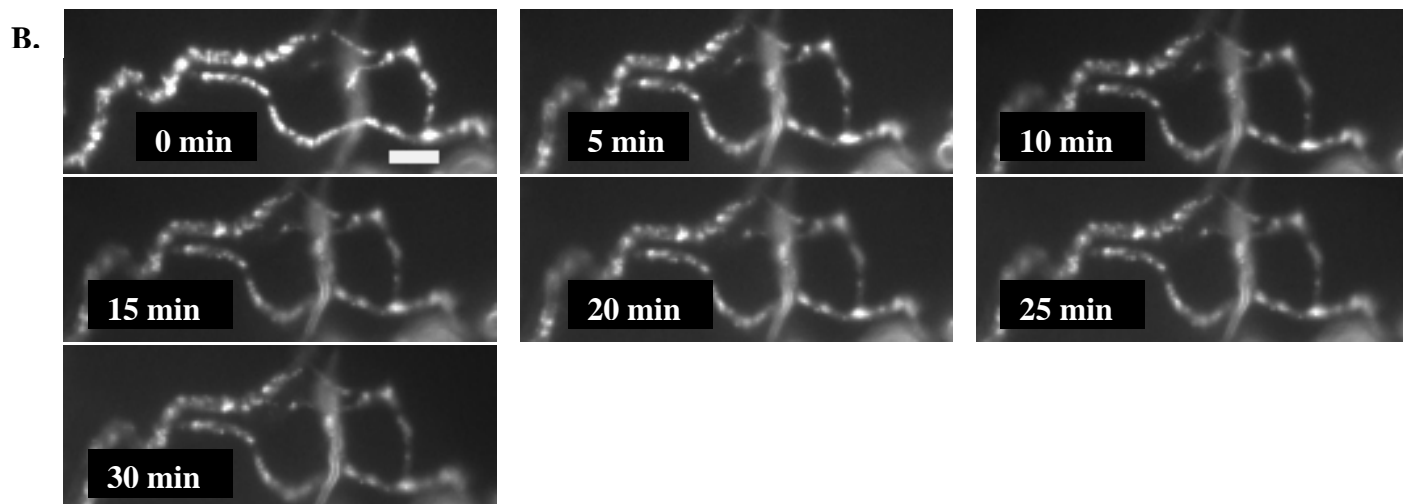
Para análise dos efeitos da metilamina na exocitose em junção neuromuscular de rã, terminações marcadas com FM1-43 na presença da droga foram incubadas em solução Ringer com 60mM KCl contendo metilamina a 10M. Após 30min de tratamento, houve desmarcação dos pontos fluorescentes, indicando ocorrência de liberação vesicular com conseqüente extrusão do FM1-43 para o meio (Figura 11C). Foi realizado experimento controle, na ausência da droga, no músculo contralateral

seguinto os mesmos parâmetros de 11C a fim de comparar resultados obtidos (Figura 11B). Análise estatística demonstrou que a queda de fluorescência após tratamento com 10M de metilamina é significativa em relação a *fotodesmarcação*, confirmando a ocorrência de excitose evocada pelo estímulo despolarizante na presença de metilamina (Figura 11C). Como podemos observar na Figura 11D, não houve diferença estatisticamente significativa entre a desmarcação da preparação banhada em solução Ringer com 60mM KCl na ausência ou presença de 10M metilamina.

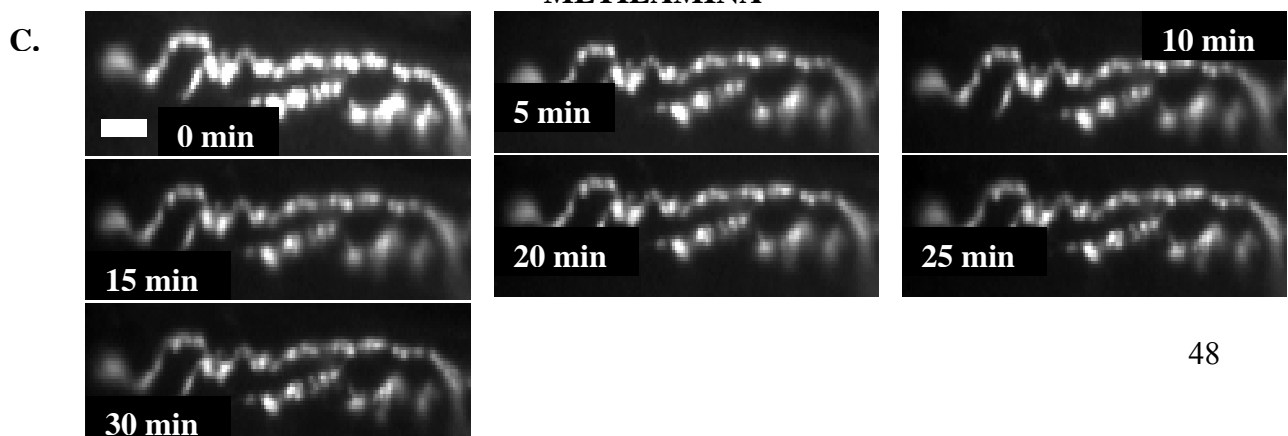
FOTODESMARCAÇÃO



CONTROLE



METILAMINA



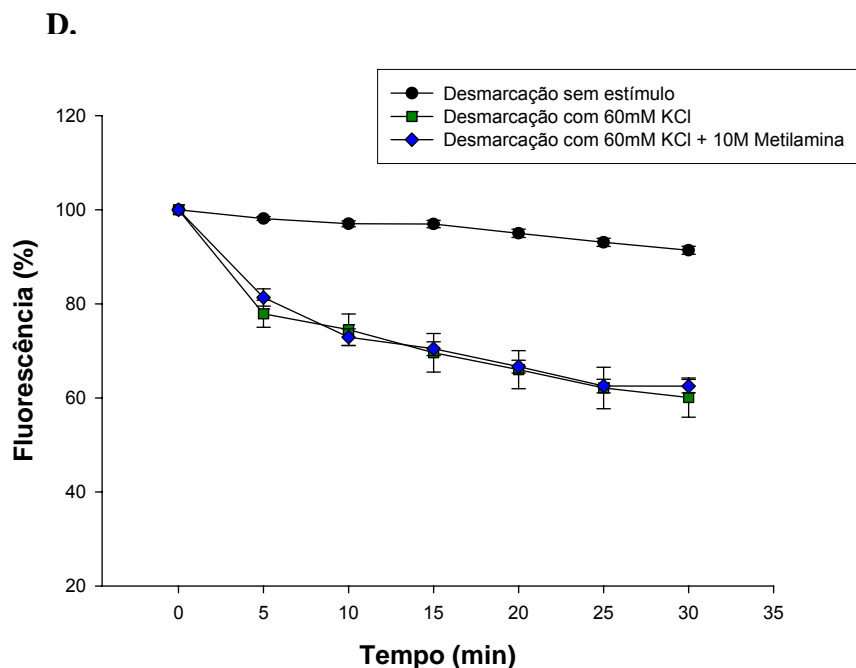


Figura 11: Metilamina não interfere na liberação vesicular evocada por KCl, havendo conseqüente desmarcação de terminações axonais contendo FM1-43. **(A)** Terminal axonal durante 30min de experimento com exposições à luz polarizada em intervalos de 5min para coleta de imagens. Redução do sinal fluorescente representa desmarcação sem estímulo (*fotodesmarcação*) por iluminação repetida da preparação. **(B)** Terminação marcada com FM1-43 na ausência da droga durante 30min de experimento em meio contendo 60mM KCl, com exposições à luz polarizada em intervalos de 5min para coleta de imagens. Desmarcação indica exocitose evocada pelo estímulo despolarizante. **(C)** Terminação axonal marcada com FM1-43 na presença de 10M metilamina durante 30min de experimento em meio contendo 60mM KCl, além da droga, com exposições à luz polarizada em intervalos de 5min para coleta de imagens. Desmarcação indica exocitose evocada pelo estímulo despolarizante na presença da droga. **(D)** Gráfico demonstrando que a exocitose evocada pelo estímulo despolarizante na ausência de metilamina é semelhante à desmarcação realizada na presença da droga. Ao final de 30min, a desmarcação induzida na presença e ausência da droga é significativa em relação a *fotodesmarcação* ($P < 0,05$). Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa entre desmarcação com KCl sozinho ou associado à metilamina. ($P = 0,4643709742$). Fotodesmarcação: representação de 3 experimentos, 30 spots; Controle: representação de 3 experimentos, 16 spots; Metilamina: representação de 3 experimentos, 26 spots. (Barra de escala de $10\mu\text{m}$ representando o erro padrão).

4.3- Liberação de Acetilcolina em Fatias de Córtex Cerebral de Rato

Com o intuito de testar se as drogas utilizadas interferiam com o conteúdo quantal de ACh, realizou-se experimentos nos quais mediu-se a liberação de ACh na presença ou na ausência de vesamicol, NH_4Cl e metilamina.

Como podemos observar na Figura 12, as drogas utilizadas realmente interferiram com a liberação de acetilcolina evocada por KCl, sendo que a inibição foi mais significativa na presença de NH₄Cl e vesamicol.

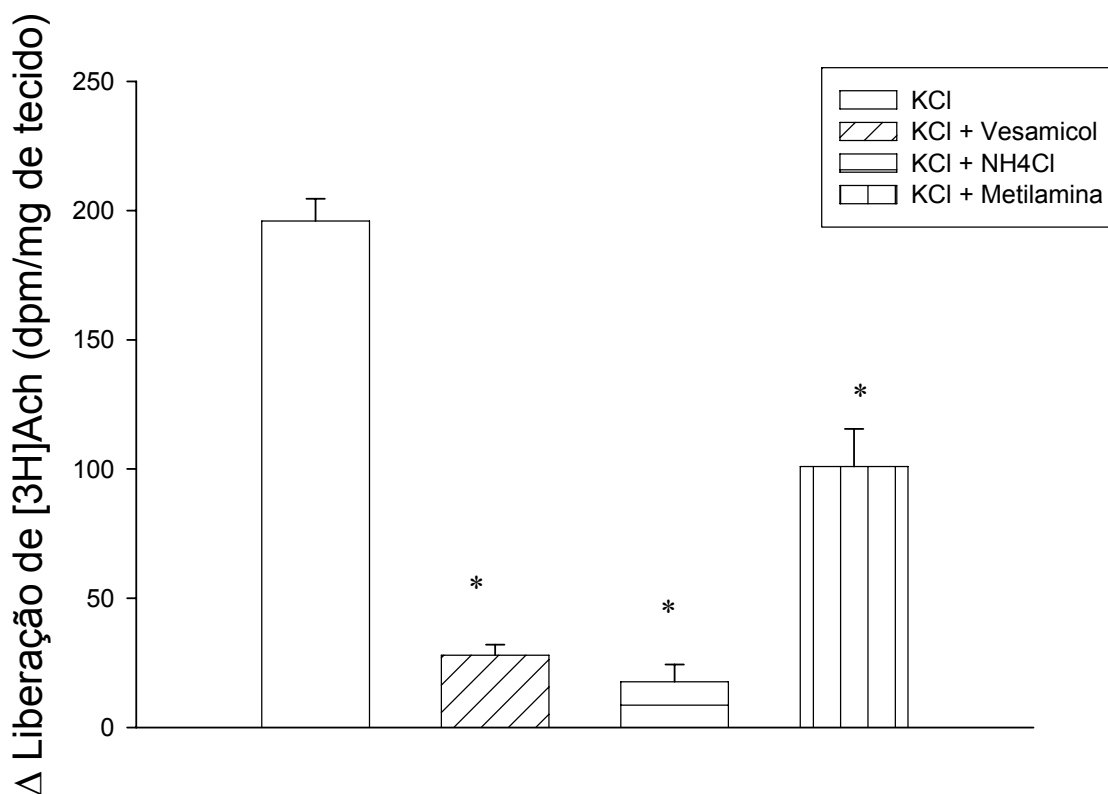


Figura 12: Efeito das drogas vesamicol, NH₄Cl e metilamina, que promovem depleção de neurotransmissores da vesícula sináptica, na liberação de [³H]-ACh em fatias de córtex cerebral de rato. Fatias de córtex cerebral de rato (40mg), foram incubadas por 30min em solução salina na ausência (controle) ou na presença de 2 μM vesamicol, 30mM NH₄Cl, 10M metilamina e então marcadas com [³H]-colina. Após duas etapas de lavagem, as fatias, após pré-incubação de 5min, foram incubadas por 15min em solução salina na ausência (controle) ou na presença de 60mM KCl. Os resultados foram obtidos pelo Δ da liberação de [³H]ACh, que corresponde à seguinte relação:

- KCl - controle
- KCl (Vesamicol) - Vesamicol
- KCl (NH₄Cl) - NH₄Cl
- KCl (Metilamina) - Metilamina

Os resultados expressam a média ± EPM de pelo menos três experimentos individuais realizados em duplicatas.

* P<0.05 vesamicol + KCl versus KCl, NH₄Cl + KCl versus KCl, metilamina + KCl versus KCl (P=0,0020251993; P=0,0025303235; P=0,0071614791, respectivamente).

5 - Discussão

Em estudos utilizando técnicas de eletrofisiologia, reduções na resposta à liberação de neurotransmissores são interpretadas como evidências de alterações na modulação pós-sináptica. Todavia, alterações no conteúdo vesicular podem também resultar de alterações pré-sinápticas no empacotamento de neurotransmissor e conseqüentemente, nas respostas fisiológicas ao neurotransmissor (Reimer *et al.*, 1998). A fim de se estudar a reciclagem de vesículas sinápticas com conteúdo vesicular reduzido, utilizamos drogas que depletam o conteúdo vesicular de ACh como vesamicol, NH₄Cl e metilamina. Utilizou-se a sonda fluorescente FM1-43 para marcação de vesículas e monitoramento do ciclo sináptico em junção neuromuscular de rã. A molécula de FM1-43 é anfipática e apresenta afinidade pela membrana celular graças a sua cauda hidrofóbica, possibilitando que o marcador seja captado pelas vesículas durante a endocitose e que aglomerados vesiculares contendo o marcador sejam visualizados em microscópio de fluorescência. Com a exocitose ocorre a liberação e difusão da sonda para o meio, resultando em redução do sinal fluorescente dos estoques vesiculares.

Com intuito de se promover exocitose, utilizou-se estimulação com solução despolarizante (60mM KCl, 10min) por ser uma técnica que se assemelha ao disparo fisiológico desencadeado pela passagem de um potencial de ação pelo terminal axonal com subsequente ativação de canais para cálcio sensíveis à voltagem. Após liberação vesicular, durante a endocitose compensatória, os aglomerados vesiculares foram reconstituídos com vesículas contendo moléculas de FM1-43 e se apresentavam ao microscópio de fluorescência como pontos brilhantes enfileirados e, geralmente, dispostos longitudinalmente ao longo do trajeto das fibras musculares. Este é o padrão típico de marcação de terminações axonais motoras em músculo estriado esquelético de anfíbio, sendo possível estabelecer uma relação de semelhança com um colar de pérolas (Guatimosim *et al.*, 1998). Cada ponto fluorescente representa aglomerados vesiculares associados às zonas ativas e em aposição aos agrupamentos de receptores nicotínicos de acetilcolina presentes na membrana pós-sináptica. Portanto, esses círculos fluorescentes indicam regiões de contato sináptico (Betz *et al.*, 1992).

A qualidade das imagens obtidas, com o padrão puntiforme clássico, indica que o protocolo de marcação com solução despolarizante é viável e adequado ao estudo do ciclo sináptico em junção neuromuscular de rã, além de confirmar a excelência do

FM1-43 como ferramenta de monitoramento dos passos de exocitose e endocitose de vesículas sinápticas em preparações não submetidas a processo de fixação.

Preparações incubadas com vesamicol, NH_4Cl e metilamina na presença de FM1-43 por tempo suficiente para que o ciclo de exocitose/endocitose permitisse a incorporação do marcador no interior de vesículas sinápticas apresentaram-se com terminações com pontos fluorescentes, indicando ocorrência da endocitose compensatória. Não foi observada diferença nas imagens obtidas tanto na ausência quanto na presença das drogas (Figura 6, 7 e 8). Quando os terminais axonais marcados com FM1-43 eram submetidos ao tratamento com estas drogas na presença de solução despolarizante, ocorria redução ao longo do tempo da intensidade do sinal fluorescente emitido pelos aglomerados vesiculares marcados com a sonda. As curvas de desmarcação das terminações tratadas com essas drogas encontram-se abaixo da curva de fotodesmarcação. Esse grau de desmarcação é similar a desmarcação observada após estímulo com solução despolarizante em preparações controle. Vesamicol, NH_4Cl e seus respectivos controles promoveram uma redução de aproximadamente 50% na intensidade do sinal fluorescente de agrupamentos vesiculares marcados com FM1-43 ao final de 30min de estimulação. Interessante notar que metilamina e seu controle promoveram uma redução de aproximadamente 40% na intensidade do sinal fluorescente. Contudo, as curvas de desmarcação dessas preparações indicam claramente liberação vesicular de maneira dependente do tempo. No entanto, restava a dúvida se as drogas utilizadas realmente reduziam o conteúdo vesicular de ACh. Dessa forma, foram realizados experimentos nos quais mediu-se a liberação de ACh na presença ou na ausência de vesamicol, NH_4Cl e metilamina em fatias de córtex cerebral de rato. As três drogas utilizadas reduziram a liberação vesicular de ACh de forma significativa, confirmando, portanto, sua eficácia.

A exocitose constitui o principal mecanismo celular para a secreção de neurotransmissores. Este achado sustenta a teoria clássica da neurotransmissão, segundo a qual os neurotransmissores são liberados em quantias discretas a partir do terminal nervoso para a célula pós-sináptica (Del Castillo & Katz, 1954). A liberação de ACh a partir de terminais nervosos colinérgicos ocorre através da exocitose dos conteúdos das VS. As vesículas colinérgicas estocam ACh em uma concentração 100 vezes maior do que a concentração presente no citoplasma (Parsons *et al.*, 1993). Estudos prévios demonstraram que certas drogas alteram o conteúdo vesicular e outras a cinética da exocitose (Borges *et al.*, 2002; Burgoyne & Barclay, 2002; Camacho *et al.*, 2006).

Parece que a cinética da exocitose é mais sensível ao pH do que variações no conteúdo de transmissores, embora o pH tenha um papel importante no conteúdo vesicular na exocitose (Camacho *et al.*, 2006). No entanto, nossos resultados demonstram que não houve diferença na cinética de desmarcação com o FM1-43 na presença de vesamicol, NH₄Cl ou metilamina. Como essa técnica não mede a exocitose em tempo real, pode ser que essas diferenças existam, contudo não podem ser visualizadas através da desmarcação do FM1-43.

O pH intravesicular representa um passo necessário para ocorrência de muitos sinais intracelulares nos eventos secretórios (Camacho *et al.*, 2006). Um aumento no pH de vesículas secretórias pode influenciar muitos aspectos da função vesicular, incluindo a organização da matriz dessas vesículas, a capacidade para o transporte de outras pequenas moléculas e atividade e maturação de pró-hormônios (Blackmore *et al.*, 2001). Durante os ciclos de exocitose/endocitose, as VS perdem seus conteúdos ácidos e devem ser reacidificadas para se prepararem para um novo ciclo. A reacidificação pode ser um fator limitante para todo o ciclo sináptico (Melnik *et al.*, 2001). A acidificação vesicular parece acelerar a exocitose, assim, atingindo altas concentrações de neurotransmissor no alvo pós-sináptico (Camacho *et al.*, 2006). Cousin & Nicholls, 1997, demonstraram que a via de reciclagem de VS em culturas de neurônios granulares de cerebelo de ratos não pode distinguir entre uma VS cheia ou vazia, que a acidificação vesicular não é necessária para a reciclagem de VS e que o preenchimento da VS é extremamente rápido. Não há uma necessidade de as VS estarem polarizadas, ácidas ou cheias de transmissor durante algum passo da ancoragem vesicular, exocitose ou endocitose. VS com ausência de gradiente de próton e vazias de neurotransmissor são endocitadas, recicladas e exocitadas de maneira indistinguível daquelas VS com V-ATPase funcional (Cousin & Nicholls, 1997), todavia, vesículas vazias não produzem nenhuma resposta pós-sináptica (Melnik *et al.*, 2001). Nossos resultados em JNM corroboram os obtidos em neurônios granulares. Vale salientar que ambos os estudos foram realizados utilizando sonda fluorescente da família FM.

Estudo clássico da natureza da transmissão sináptica sugere que uma quantidade relativamente fixa de neurotransmissores é empacotada dentro das VS (Del Castillo & Katz, 1954; Zimmermann & Whittaker, 1974). Acreditava-se que a extensão do preenchimento vesicular e a taxa na qual as VS eram preenchidas poderiam ter efeitos significativos na transmissão sináptica (Zhou *et al.*, 2000). Na JNM de vertebrados, a captação de ACh para dentro de VS é bloqueada pelo vesamicol (Marshall & Parsons,

1987; Parsons *et al.*, 1993), o qual produz depressão dependente de estímulo nervoso do conteúdo vesicular (Searl *et al.*, 1990, 1991; Van der Kloot *et al.*, 2000).

O vesamicol inibe a captação de ACh de forma aparentemente não competitiva (Bahr & Parsons, 1986; Kornreich & Parsons, 1988), ligando-se a um receptor protéico orientado citoplasmaticamente e que não é a ATPase (Kornreich & Parsons, 1988), sendo um potente inibidor do estoque de ACh em VS do órgão elétrico de peixes do gênero Torpedo (Anderson *et al.*, 1983; Bahr & Parsons, 1986). Como resultado de seu bloqueio, há uma inibição da liberação evocada de ACh em várias preparações (Brittain *et al.*, 1969; Marshall, 1970; Melega & Howard, 1984). O vesamicol inibe a liberação de ACh estimulada por KCl em fatias de córtex cerebral de ratos (Jope & Johnson, 1985; Leão *et al.*, 1995). Este efeito parece ser consequência direta da inibição do carregamento vesicular de ACh embora possua também propriedades inibitórias na síntese de ACh (Jope & Johnson, 1985). Além disso, sabe-se que o vesamicol também inibe liberação espontânea de ACh em fatias de córtex cerebral de rato (Prado *et al.*, 1990). Parsons *et al.*, 1999, inibiram o transportador vesicular de ACh com vesamicol em junção neuromuscular de cobra e estimularam a preparação com solução de alta concentração de KCl. Uma vez que os estoques pré-formados de transmissor foram depletados e as correntes pós-sinápticas eliminadas, os autores testaram se a endocitose e exocitose continuavam a ocorrer no terminal, utilizando como ferramenta o FM1-43. VS colinérgicas recicladas continuaram a sofrer endocitose e exocitose apesar de não terem sido preenchidas com ACh (Parsons *et al.*, 1999). Assim, como nos terminais glutamatérgicos em células granulares de cerebelo (Cousin & Nicholls, 1997), o transporte de transmissor, neste caso, ACh, para dentro de VS colinérgicas recicladas não é necessário para ciclos repetitivos de exocitose e endocitose durante estimulação prolongada de terminais nervosos motores (Parsons *et al.*, 1999). Esta liberação de vesículas marcadas com FM1-43 evocada por KCl na presença de vesamicol está em consonância com os achados neste trabalho (Figura 9).

Diferentemente do vesamicol, o Cloreto de amônio (NH₄Cl) inibe a captação de ACh para o interior das VS através da redução do gradiente de próton através da membrana vesicular, o qual é necessário para acúmulo do transmissor (revisado por Parsons *et al.*, 1993; Van der Kloot *et al.*, 1994). Grânulos contendo catecolaminas têm um interior ácido, gerado por uma bomba de prótons direcionada por ATP. O gradiente de prótons é responsável por parte da captação de catecolaminas. Este gradiente de prótons de grânulos isolados é reduzido pela adição de NH₄⁺ na solução,

uma vez que NH_4^+ produz pequenas quantidades de NH_3 , o qual difunde através da membrana do grânulo. Uma vez dentro, NH_3 combina com prótons para formar NH_4^+ , diminuindo a acidez do interior. O acúmulo de catecolaminas é então reduzido (Winkler & Carmichael, 1982). Na década de 80, foi sugerido que o carregamento de ACh para dentro de VS também requeria um gradiente de próton (Toll & Howard, 1980). A fim de testar esta hipótese, Van der Kloot, 1987, realizou um estudo testando os efeitos do NH_4^+ e outras aminas no aumento do conteúdo vesicular observado em JNM de rãs através da mensuração de MEPPs (potenciais pós-sinápticos em miniatura) e MEPCs (correntes pós-sinápticas excitatórias). Preparações colocadas em solução contendo NH_4Cl adicionadas a solução Ringer normal apresentaram MEPPs de amplitude semelhante aos controles não expostos ao NH_4^+ . Isto mostra que o NH_4^+ não reduz a sensibilidade de receptores de ACh ou o input de resistência da fibra muscular e que isto não causa a perda de ACh do quanta já carregado. Em repouso, há pouca entrada de transmissor recentemente sintetizado no quanta e a inibição de sua captação não produz uma redução detectável na amplitude dos MEPPs. Todavia, adicionando-se NH_4^+ a soluções hipertônicas, há uma inibição do aumento do conteúdo vesicular, com redução significativa dos MEPPs. Estes resultados sustentam a idéia de que um gradiente de prótons é necessário para o preenchimento de ACh no quanta e são consistentes com a hipótese de que a liberação do quanta de ACh ocorre a partir de VS através da exocitose. No entanto, os dados obtidos nesse trabalho mostram que apesar do gradiente de próton ser crucial para o armazenamento de ACh nas VS, esse gradiente não interfere com a exocitose das mesmas (Figura 10).

No pH de 5.5, os conteúdos de grânulos secretórios têm uma ótima associação entre si, o que facilita o estoque de transmissor, mas quando exposto ao pH do fluido extracelular durante a fusão da membrana da VS, a associação enfraquece e a matriz intravesicular desemaranha (Jankowski *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1995; Yoo, 1996). Além de promover a associação intravesicular em células cromafinas isoladas da medula da Adrenal, um interior vesicular ácido é necessário para o empacotamento de catecolaminas pelo transportador vesicular de monoamina, VMAT (Njus *et al.*, 1986; Henry *et al.*, 1998). Consistente com ambos mecanismos de estoque e transporte, a liberação evocada de catecolamina é reduzida após incubação com metilamina (Kuijpers *et al.*, 1989), uma base fraca permeável à membrana que aumenta o pH intravesicular de 5.5 para 6.3 (Holz *et al.*, 1983), colapsando o ΔpH sem contudo comprometer o potencial de membrana transvesicular, ($\Delta\Psi$) (Cousin & Nicholls, 1997). Metilamina

acessa o interior vesicular pela difusão passiva de sua forma não protonada através das membranas celular e vesicular (Scherman & Henry, 1980). Metilamina causou liberação exocitótica sem a adição de secretagogos em cultura de células cromafinas, causando quantidade significativa de dissociação vesicular antes da exocitose, como evidenciado pelos níveis aumentados de Ca^{+2} intracelular e catecolamina (Mundorf *et al.*, 1999). Metilamina dispersa catecolaminas em células cromafinas adrenais, reduzindo a cinética da exocitose (Camacho *et al.*, 2006). Por outro lado, em culturas de células cerebelares marcadas com FM2-10, VS vazias ou sem gradiente de próton devido à inibição da V-ATPase pela bafilomicina e neutralização do ΔpH pela metilamina foram endocitadas, recicladas e exocitadas normalmente (Cousin & Nicholls, 1997). O mesmo resultado foi obtido neste trabalho (Figura 11). Possivelmente, a discrepância dos dados obtidos neste trabalho e nos de Cousin & Nicholls, 1997 e Camacho *et al.*, 2006 se deve ao fato de o FM não mensurar a exocitose em tempo real.

Como vimos, o conteúdo de transmissor das vesículas sinápticas pode ser dramaticamente reduzido por drogas específicas, todavia a maquinaria exocítica continua liberando VS vazias ou parcialmente preenchidas com probabilidade normal. Isto nos leva ao seguinte questionamento: será que a quantidade de transmissor das VS pode ser alterada também por mecanismos fisiológicos? Tem-se estimado que o tempo entre a endocitose de uma vesícula e seu amadurecimento para um novo ciclo é rápido e em culturas de neurônios chega a ser de 15 segundos, sendo que o preenchimento da VS é extremamente rápido. Este processo requer transportadores vesiculares bastante rápidos, garantindo a preservação da transmissão sináptica. As VS recentemente endocitadas se misturam rapidamente à população de liberação rápida (Ryan & Smith, 1995). Considerando a extensão da população vesicular (aproximadamente 500000 vesículas em JNM de rã) (Rizzoli & Betz, 2005), a velocidade do preenchimento e da liberação sináptica é provável que, fisiologicamente, poucas VS se encontrem vazias. Vale salientar que, possivelmente, a velocidade do preenchimento deve ser modulada de acordo com a atividade neuronal, a qual serve como mecanismo para se evitar que vesículas vazias sejam liberadas, levando à paralisia da neurotransmissão.

Uma variedade de estudos utilizou a JNM de vertebrados como modelo experimental para alterar a quantidade de neurotransmissor dentro das VS e determinar suas conseqüências na transmissão sináptica. O preenchimento das VS com ACh foi alterado pelo bloqueio da captação de colina (Elmqvist & Quastel, 1965; Jones & Kwanbunbumpen, 1970; Ceccarelli & Hulburt, 1975), bloqueio do transportador

vesicular de ACh (VACHT) (Van der Kloot, 1986; Searl *et al.*, 1991; Prior *et al.*, 1992; Parsons *et al.*, 1999), alteração do número de moléculas de VACHT funcionais expressas na membrana vesicular (Song *et al.*, 1997) e mais recentemente, através do desenvolvimento de animais knockdown para VACHT (Prado *et al.*, 2006).

No entanto, ainda resta a pergunta: quais mecanismos regulam a quantidade de neurotransmissor por vesícula? O transporte para o interior de vesículas secretórias é catalizado por proteínas que acoplam a captação de neurotransmissor ao movimento de H^+ em direção oposta. A H^+ V-ATPase localizada na membrana da VS é responsável pela manutenção de um gradiente de potencial próton-eletróquímico transmembrana. Assim, alterações na atividade da V-ATPase influenciam na quantidade de transmissor estocado nas VS (Hnasko & Edwards, 2006). Em terminais glutamatérgicos, o potencial de membrana é responsável pelo acúmulo e retenção de aminoácidos acídicos (Maycox *et al.*, 1990).

Um outro mecanismo que controla o conteúdo de transmissor das VS é o número de transportadores vesiculares de neurotransmissores, sendo que, em terminais nervosos colinérgicos, o VACHT é o responsável pela quantidade de neurotransmissor estocada e liberada (Reimer *et al.*, 1998; Prado *et al.*, 2002). Em muitos sistemas, o aumento do nível de transportadores pode aumentar a quantidade de neurotransmissor acumulada no interior das vesículas (Song *et al.*, 1997; Colliver *et al.*, 2000; Pothos *et al.*, 2000; Daniels *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2005). Dados da literatura sugerem que a superexpressão do VACHT, do transportador vesicular de monoamina neuronal (VMAT2) ou do transportador vesicular de glutamato (VGLUT) aumentam o conteúdo vesicular em cultura (Song *et al.*, 1997; Colliver *et al.*, 2000; Pothos *et al.*, 2000; Wojcik *et al.*, 2004; Daniels *et al.*, 2006). Assim, alterações na expressão do transportador têm o potencial de influenciar na resposta ao neurotransmissor (Partilla *et al.*, 2006). Da mesma forma, a diminuição da expressão dos transportadores vesiculares também interfere na resposta pós-sináptica. Em sinapses glutamatérgicas, o VGLUT preenche a vesícula com glutamato (Daniels *et al.*, 2006) e, na ausência deste transportador, as vesículas se encontram vazias (Fremeau *et al.*, 2004; Wojcik *et al.*, 2004). Interessante notar que nos knockouts para o VGLUT, as vesículas sem o transportador reciclam normalmente (Daniels *et al.*, 2006), consistente com medidas ópticas da reciclagem de VS em culturas de neurônios hipocámpais de camundongos knockouts para o mesmo transportador que demonstraram que não há diferença na atividade exocítica e endocítica de sinapses do tipo selvagem e knockout para VGLUT1

(Wojcik *et al.*, 2004). O mesmo tipo de observação foi obtido em sinapses colinérgicas. Prado *et al.*, 2006, desenvolveram um modelo *in vivo* de camundongo com expressão genética reduzida de VAcHT. Como os knockouts morrem ao nascimento devido à falência respiratória, os autores deram origem a um animal knockdown que produz uma menor quantidade da proteína VAcHT (50% menos do que o tipo selvagem para heterozigoto e 70% menos para homozigoto). Em JNM, os mutantes exibiram moderada redução na amplitude dos MEPPs, sugerindo uma redução no conteúdo vesicular em repouso. Além disto, camundongos knockdown homozigotos apresentaram elevada depressão sináptica sob estimulação de alta frequência, sugerindo defeito severo no preenchimento de VS recicladas. Por outro lado, a exocitose e endocitose de VS parecem estar normal mesmo se as vesículas não estão cheias, consistente com os dados obtidos neste trabalho através de tratamento farmacológico. Juntos, estes resultados demonstram que a biogênese das VS e reciclagem são independentes do preenchimento vesicular com o transmissor.

6 – Conclusão e Perspectivas

Vesamicol, NH_4Cl e metilamina não interferem com a reciclagem de vesículas sinápticas em junção neuromuscular de rã independentemente da redução do conteúdo de ACh. Além de não interferirem com a liberação vesicular evocada, estas drogas não inibem a endocitose independente de variações no pH intravesicular. Utilizando FM1-43 para mensurar diretamente a probabilidade da exocitose/endocitose de vesículas sinápticas observou-se que, apesar da severa redução no conteúdo vesicular de ACh, essas vesículas foram liberadas com a mesma probabilidade que aquelas cujo conteúdo de neurotransmissor encontrava-se normal. Portanto, a probabilidade de reciclagem de VS parece ser inteiramente independente do estado de preenchimento da vesícula. Isto nos leva a um importante questionamento: será que a quantidade de neurotransmissor nas vesículas pode ser alterada também por processos fisiológicos? Diante dos achados apresentados neste trabalho, estas drogas se apresentam como uma importante ferramenta farmacológica para estudo do ciclo sináptico, ajudando no entendimento do papel do preenchimento no ciclo de VS e seu potencial para regulação na plasticidade neuronal. Os dados apresentados neste trabalho podem futuramente nortear abordagens celulares e moleculares que esclareçam como as alterações no gradiente químico do componente eletroquímico e outras, desencadeadas por vesamicol, NH_4Cl e metilamina, interferem com a maquinaria protéica que regula o tráfego de vesículas sinápticas e, ainda, subsidiar meios para intervenção farmacológica em disfunções da transmissão sináptica central e periférica. Desta forma, os achados apresentados neste trabalho contribuem para melhor compreensão do sistema colinérgico e neurotransmissão em geral.

7 – Referências Bibliográficas

AHNERT-HILGER, G.; HOLTJE, M.; PAHNER, I.; WINTER, S.; BRUNK, I. Regulation of vesicular neurotransmitter transporters. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 150, p. 140-160, 2003.

ANDERSON, D. C.; KING, S. C.; PARSONS, S. M. Inhibition of [³H]acetylcholine active transport by tetraphenylborate and other anions. **Mol Pharmacol.**, v. 24, p. 55-59, 1983.

BAHR, B. A. & PARSONS, S. M. Acetylcholine transport and drug inhibition kinetics in Torpedo synaptic vesicles. **J Neurochem.**, v. 46, p. 1214-1218, 1986.

BETZ, W. J.; MAO, F.; BEWICK, G. S. Activity dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. **The Journal of Neuroscience**, v. 12, p.363-375, fev.1992.

BETZ, W. J.; MAO, F.; SMITH, Corey B. Imaging exocytosis and endocytosis. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, p. 365-371, jun. 1996.

BLACKMORE, C. G.; VARRO, A.; DIMALINE, R.; BISHOP, L.; GALLACHER, D. V.; DOCKRAY, G. J. Measurement of secretory vesicle pH reveals intravesicular alkalization by vesicular monoamine transporter type 2 resulting in inhibition of prohormone cleavage. **Journal of Physiology**, v. 531, p. 605-617, 2001.

BONIFACINO, J. S. & GLICK, B. S. The mechanisms of vesicle budding and fusion. **Cell**, v. 116, p. 153-166, 2004.

BORGES, R.; MACHADO, J. D.; BETANCOR, G.; CAMACHO, M. Pharmacological regulation of the late steps of exocytosis. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 971, p. 184-192, 2002.

BRITTAIN, R. T.; LEVY, G. P.; TYERS, M. B. The neuromuscular blocking action of 2-(4-phenylpiperidino) cyclohexanol (AH5183). **Eur J Pharmacol.**, v. 8, p. 93-99, 1969.

BROSE, N.; PETRENKO, A. G.; SUDHOF, T. C.; JAHN, R. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. **Science**, v. 256, p. 1021-1025, 1992.

BRUMBACK, A. C.; LIEBER, J.L.; ANGLESON, J. K.; BETZ, W. J. Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis. **Methods**, v. 33, p. 287-294, ago. 2004.

BURGOYNE, R. D. & BARCLAY, J. W. Splitting the quantum: regulation of quantal release during vesicle fusion. **Trends Neurosci.**, v. 25, p. 176-178, 2002.

CAMACHO, M.; MACHADO, J. D.; MONTESINOS, M. S.; CRIADO, M.; BORGES, R. Intragranular pH rapidly modulates exocytosis in adrenal chromaffin cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, p. 324-334, 2006.

CECCARELLI, B.; HULBURT, W. P.; MAURO, A. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. **The Journal of Cell Biology**, v. 57, p. 499-524, maio de 1973.

CECCARELLI, B. & HULBURT, A. The effects of prolonged repetitive stimulation in hemicholinium on the frog neuromuscular junction. **Journal of Physiology**, v. 247, p. 163-188, 1975.

CECCARELLI, B.; GROHOVAZ, F.; HULBURT, W. P. Freeze-fracture studies of frog neuromuscular junctions during intense release of neurotransmitter. I. Effects of black widow spider venom and Ca²⁺-free solutions on the structure of the active zone. **The Journal of Cell Biology**, v. 81, p. 163-177, 1979a.

CECCARELLI, B.; GROHOVAZ, F.; HULBURT, W. P. Freeze-fracture studies of frog neuromuscular junctions during intense release of neurotransmitter. II. Effects of

electrical stimulation and high potassium. **The Journal of Cell Biology**, v. 81, p. 178-192, 1979b.

CECCARELLI, B.; HULBURT, W. P.; MAURO, A. The vesicle hypothesis of the release of quanta of acetylcholine. **Physiological Reviews**, v. 60, p. 396-441, 1980.

CECCARELLI, B.; FESCE, R.; GROHOVAZ, F.; HAIMANN, C. The effect of potassium on exocytosis of transmitter at the frog neuromuscular junction. **Journal of Physiology**, v. 401, p. 163-183, 1988.

COLLIVER, T. L.; PYOTT, S. J.; ACHALABUN, M.; EWING, A. VMAT-Mediated Changes in Quantal Size and Vesicular Volume. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 5276-5282, 2000.

COOKE, J. D. & QUASTEL, D. M. The specific effect of potassium on transmitter release by motor nerve terminals and its inhibition by calcium. **J Physiol.**, v. 228, p. 435-458, 1973.

COUSIN, M. A. & NICHOLLS, D. G. Synaptic Vesicle Recycling in Cultured Cerebellar Granule Cells: Role of Vesicular Acidification and Refilling. **J. Neurochem.**, v. 69, p. 1927-1935, 1997.

DANIELS, R. W.; COLLINS, C. A.; GELFAND, M. V.; DANT, J.; BROOKS, E. S.; KRANTZ, D. E. DiANTONIO, A. Increased expression of the Drosophila vesicular glutamate transporter leads to excess glutamate release and a compensatory decrease in quantal content. **J. Neurosci.**, v. 24, p. 10466-10474, 2004.

DANIELS, R. W.; COLLINS, C. A.; CHEN, K.; GELFAND, M. V.; Featherstone, D. E.; DiANTONIO, A. A Single Vesicular Glutamate Transporter Is Sufficient to Fill a Synaptic Vesicle. **Neuron.**, v. 49, p. 11-16, 2006.

DE CAMILLI, P.; HAUCKE, V.; TAKEI, K.; MUGNAINI, E. The structure of synapses. In *Synapses*, WM Cowan, TC Sudhof, CF Stevens. Baltimore, MD: Johns Hopkins Univ. Press, p. 89-133, 2001.

DEL CASTILLO, J. & KATZ, B. Quantal components of the endplate potential. **Journal of Physiology**, v. 124, p. 560-573, 1954.

ELMQVIST, D. & QUASTEL, D. M. J. Presynaptic action of hemicholinium at the neuromuscular junction. **Journal of Physiology (London)**, v. 177, p. 463-482, 1965.

FARSAD, K.; RINGSTAD, N.; TAKEI, K.; FLOYD, S. R.; ROSE, K.; DE CAMILLI, P. Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. **J. Cell Biol.**, v. 155, p. 193-200, 2001.

FERGESTAD, T. & BROADIE, K. Interaction of stoned and synaptotagmin in synaptic vesicle endocytosis. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 1218-1227, 2001.

FERNANDEZ-CHACON, R., KONIGSTORFER, A.; GERBER, S. H.; GARCIA, J.; MATOS, M. F.; STEVENS, C. F. *et al.* Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Sudhof TC. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. **Nature**, v. 410, p. 41-49, 2001.

FESCE, R.; GROHOVAZ, F.; HAIMANN, C.; CECCARELLI, B. Different patterns of vesicle fusion during quantal release of acetylcholine at the frog neuromuscular junction. **Caryologia**, v. 35, p. 122, 1982.

FORD, M. G.; MILLS, I. G.; PETER, B. J.; VALLIS, Y.; PRAEFCKE, G. J. *et al.* Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. **Nature**, v. 419, p. 361-366, 2002.

FREMEAU, R. T.; KAM, K.; QURESHI, T.; JOHNSON, J.; COPENHAGEN, D. R.; STORM-MATHISEN, J. *et al.* Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. **Science**, v. 304, p. 1815-1819, 2004.

FUKUDA, M.; MOREIRA, J. E.; LEWIS, F. M.; SUGIMORI, M.; NIINOBE, M.; MIKOSHIBA, K. *et al.* Role of the C2B domain of synaptotagmin in vesicular release and recycling as determined by specific antibody injection into the squid giant synapse preterminal. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 10708-10712, 1995.

FULDNER, H. H. & STADLER, H. P-NMR analysis of synaptic vesicles status of ATP and internal pH. **Eur. J. Biochem.**, v. 121, p. 519-524, 1982.

FUTAI, M.; OKA, T.; SUN-WADA, G.; MORIYAMA, Y.; KANAZAWA, H.; WADA, Y. Luminal acidification of diverse organelles by V-ATPase in animal cells. **J. Exp. Biol.**, v. 203, p. 107-116, 2000.

GAGE, P. W. & QUASTEL, D. M. Dual effect of potassium on transmitter release. **Nature**, v. 206, p. 625-626, 1965.

GANDHI, S. P. & STEVENS, C. F. Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. **Nature**, v. 423, n. 6940, p. 607-13, jun. 2003.

GARNER, C. C.; KINDLER, S.; GUNDELFINGER, E. D. Molecular determinants of presynaptic active zones. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, p. 321-327, 2000.

GASNIER, B. The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. **Biochimie**, v. 82, p. 327-337, 2000.

GEKLE, M.; MILDENBERGER, S.; FREUDINGER, R.; SILBERNAGL, S. Endosomal alkalinization reduces J_{max} and K_m of albumin receptor-mediated endocytosis in OK cells. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. 899-906, 1995.

GEPPERT, M.; GODA, Y.; HAMMER, R. E.; LI, C.; ROSAHL, T. W.; STEVENS, C. F. *et al.* Synaptotagmin I: a major Ca^{+2} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, v. 79, p. 717-727, 1994.

GUATIMOSIM, C.; ROMANO-SILVA, M. A.; GOMEZ, M. V.; PRADO, M. A. Recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction in the presence of strontium. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, n. 6, p. 2477-83, jun. 1998.

HAIMANN, C.; TORRI-TARELLI, F.; FESCE, R.; CECCARELLI, B.; Measurement of quantal secretion induced by ouabain and its correlation with depletion of synaptic vesicles. **The Journal of Cell Biology**, v. 101, p. 1953-65, nov. 1985.

HAUCKE, V. & DE CAMILLI, P. AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. **Science**, v. 285, p. 1268-1271, 1999.

HAUCKE, V.; WENK, M. R., CHAPMAN, E. R.; FARSAD, K.; DE CAMILLI, P. Dual interaction of synaptotagmin with mu2- and alpha-adaptin facilitates clathrin-coated pit nucleation. **EMBO J.**, v. 19, p. 6011-6019, 2000.

HAYDON, P. G. Glia: listening and talking to the synapse. **Nat. Rev. Neurosci**, v. 2, p. 185-193, 2001.

HENKEL, A. W.; LUBKE, J.; BETZ, W. J. FM1-43 dye ultrastructural localization in and release from frog motor nerve terminals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 1918-1923, 1996.

HENRY, J. P.; SAGNE, C.; BEDET, C.; GASBIER, G. The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain. **Neurochem. Int.**, v. 32, p. 227-246, 1998.

HERRERA, A. A. & ZENG, Y. Activity-dependent switch from synapse formation to synapse elimination during development of neuromuscular junctions. **Journal of Neurocytology**, v.32, p. 817-833, 2003.

HEUSER, J. E. & REESE T. S. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. **The Journal of Cell Biology**, v. 57, p. 315-344, maio de 1973.

HEUSER, J. E.; REESE T. S.; LANDIS, D. M. D. Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze fracture. **Journal of Neurocytology**, v. 3, p. 109-131, 1974.

HEUSER, J. E.; REESE T. S.; DENNIS, M.; JAN, L.; EVANS, L. Synaptic vesicle exocytosis captured by quick-freezing and correlated with quantal transmitter release. **The Journal of Cell Biology**, v. 81, p. 275-300, 1979.

HNASKO, T. S. & EDWARDS, R. H. Synaptic Vesicles: Half Full or Half Empty? **Neuron**, v. 51, p. 523-526, 2006.

HOLT, M. & JAHN, R. Synaptic vesicles in the fast lane. **Science**, v. 303, p. 1986-1987, 2004.

HOLZ, R. W.; SENTER, R. A.; SHARP, R. R. Evidence that the H⁺ electrochemical gradient across membranes of chromaffin granules is not involved in exocytosis. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 7506-7513, 1983.

JANKOWSKI, J. A.; SCHOEDER, T. J.; CIOLKOWSKI, E. L.; WIGHTMAN, R. M. Temporal characteristics of quantal secretion of catecholamines from adrenal medullary cells. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 14694-14700, 1993.

JAROUSSE, N.; KELLY, R. B. The AP2 binding site of synaptotagmin I is not an internalization signal but a regulator of endocytosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 154, p. 857-866, 2001.

JENTSCH, T. J.; STEIN, V.; WEINREICH, F.; ZDEBIK, A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. **Physiol Rev**, v. 82, p. 503-568, 2002.

JONES, S. F. & KWANBUNBUMPEN, S. The effects of nerve stimulation and hemicholinium on synaptic vesicles at the mammalian neuromuscular junction. **Journal of Physiology**, v. 207, p. 31-50, 1970.

JOPE, R. S. & JOHNSON, G. V. W. Quinacrine and 2-(4-henylpiperidino)cyclohexanol (AH5183) Inhibit Acetylcholine Release and Synthesis in Rat Brain Slices. **Molecular Pharmacology**, v. 29, p. 45-51, 1985.

JORGENSEN, E. M.; HARTWIEG, E.; SCHUSKE, K.; NONET, M. L.; JIN, Y.; HORVITZ, H. R. Defective recycling of synaptic vesicles in synaptotagmin mutants of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 378, p. 196-199, 1995.

KATZ, B. The Release of Neural Transmitter Substances. Liverpool: University Press, 1969.

KORNREICH, W. D. & PARSONS, S.M. Sidedness and chemical and kinetic properties of the vesamicol receptor of cholinergic synaptic vesicles. **Biochemistry**, v. 27, p. 5262-5267, 1988.

KUIJPERS, G. A.; ROSARIO, L. M.; ORNBERG, R. L. Role of intracellular pH in secretion from adrenal medulla chromaffin cells. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 698-705, 1989.

LEAO, R. M.; GOMEZ, M. V.; COLLIER, B.; PRADO, M. A. Inhibition of potassium-stimulated acetylcholine release from rat brain cortical slices by two high-affinity analogs of vesamicol. **Brain Research**, v. 703, p. 86-92, 1995.

LENCER, W. I.; STROHMEIER, G.; MOE, S.; CARLSON, S. L.; CONSTABLE, C. T.; MADARA, J. L. Signal transduction by cholera toxin: processing in vesicular compartments does not require acidification. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. 548-557, 1995.

LICHTMAN, J. W.; WILKINSON, R. S.; RICH, M. M. Multiple innervation of tonic endplates revealed by activity-dependent uptake of fluorescent probes. **Nature**, v. 314, p. 357-359, 1985.

LINDGREN, C. A.; EMERY, D. G.; HAYDON, P. G. Intracellular acidification reversibly reduces endocytosis at the neuromuscular junction. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n. 9, p. 3074-3084, maio 1997.

LITTLETON, J. T.; STERN, M.; SCHULZE, K.; PERIN, M.; BELLEN, H. J. Mutational analysis of Drosophila synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca⁺²-activated neurotransmitter release. **Cell**, v. 74, p. 1125-1134, 1993.

LITTLETON, J. T.; BAI, J.; VYAS, B.; DESAI, R.; BALTUS, A. E.; GARMENT, M. B. *et al.* Synaptotagmin mutants reveal essential functions for the C2B domain in Ca⁺²-

triggered fusion and recycling of synaptic vesicles *in vivo*. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 1421-1433, 2001.

LIU, Y. & EDWARDS, R. H. The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neurodegeneration. **Ann. Rev. Neurosci.**, v. 20, p. 125-56, 1997.

LLINAS, R.; McGUINNESS, T. L.; LEONARD, C. S.; SUGIMORI, M.; GREENGARD, P. Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 3035-3039, 1985.

LLINAS, R.; GRUNER, J. A.; SUGIMORI, M.; McGUINNESS, T. L.; GREENGARD, P. Regulation by synapsin I and Ca^{+2} -calmodulin-dependent protein kinase II of transmitter release in squid giant synapse. **J. Physiol (Lond)**, v. 436, p. 257-282, 1991.

LUPA, M. T. Effects of an inhibitor of the synaptic vesicle acetylcholine transport system on quantal neurotransmitter release: an electrophysiological study. **Brain Research**, v. 461, p. 118-126, 1988.

MARSHALL, I. G. Studies on the blocking action of 2-(4-phenyl piperidino) cyclohexanol (AH5183). **Br J Pharmacol.**, v. 38, p. 503-516, 1970.

MARSHALL, I. G. & PARSONS, S. M. The vesicular acetylcholine transport system. **Trends in Neurosciences**, v. 10, p. 174-177, 1987.

MAYCOX, P. R.; HELL, J. W.; JAHN, R. Amino acid and neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. **TINS**, V. 13, P. 83-87, 1990.

MELEGA, W. P. & HOWARD, B. D. Biochemical evidence that vesicles are the source of the acetylcholine released from stimulated PC12 cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 81, p. 6535- 6538, 1984.

MELNIK, V. I.; BIKBULATOVA, L. S.; GULYAEVA, N. V.; BAZYAN, A. S. Synaptic Vesicle Acidification and Exocytosis Studied with Acridine Orange Fluorescence in Rat Brain Synaptosomes. **Neurochemical Research**, v. 26, p. 549-554, 2001.

MICHAELSON, D. M. & ANGEL, I. Determination of Δ pH in cholinergic synaptic vesicles: its effect on storage and release of acetylcholine. **Life Sci.**, v. 27, p. 39-44, 1980.

MORGAN, J. R.; ZHAO, X.; WOMACK, M.; PRASAD, K.; AUGUSTINE, G. J.; LAFER, E. M. A role for the clathrin assembly domain of AP180 in synaptic vesicle endocytosis. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 201-212, 1999.

MUNDORF, M. L.; HOCHSTELER, S. E.; WIGHTMAN, R. M. Amine Weak Bases Disrupt Vesicular Storage and Promote Exocytosis in Chromaffin Cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, p. 2397-2405, 1999.

MURTHY, N. V. & DE CAMILLI, P. Cell Biology of the Presynaptic Terminal. **Annual Review of Neuroscience**, v. 26, p. 701-728, 2003.

NAGUIB, M.; FLOOD, P. McARDLE, J. J. BRENNER, H. R. Advances in Neurobiology of the Neuromuscular Junction – Implications for the Anesthesiologist. **Anesthesiology**, v. 96, p. 202-231, 2002.

NGUYEN, M. L.; COX, G. D.; PARSONS, S. M. Kinetic Parameters of the Vesicular Acetylcholine Transporter: Two Protons are Exchanged for One Acetylcholine. **Biochemistry**, v. 37, p. 13400-13410, set. 1998.

NISHI, T. & FORGAC, M. The vacuolar H^+ - ATPases – nature`s most versatile proton pumps. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 3, p. 94-103, 2002.

NJUS, D.; KELLEY, P. M.; HARNADEK, G. J. Biogenesis of secretory vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 853, p. 237-265, 1986.

OZKAN, E. D. & UEDA, T. Glutamate Transport and Storage in Synaptic Vesicles. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 77, p. 1-10, maio 1998.

PARSONS, S. M.; PRIOR, C.; MARSHALL, I. G. Acetylcholine transport, storage and release. **International Review of Neurobiology**, v. 35, p. 279–390, 1993.

PARSONS, S.M.; CALUPCA, M. A.; MERRIAM, L. A.; PRIOR, C. Empty Synaptic Vesicles Recycle and Undergo Exocytosis at Vesamicol-Treated Motor Nerve Terminals. **J. Neurophysiol.**, v. 81, p. 2696–2700, 1999.

PARSONS, S.M. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. **FASEB J.**, v.14, p. 2423–2434, 2000.

PARTILLA, J. S.; DEMPSEY, A. G.; NAGPAL, A. S.; BLOUGH, B. E.; BAUMANN, M. H.; ROTHMAN, R. B. Interaction of Amphetamines and Related Compounds at the Vesicular Monoamine Transporter. **JPET**, v. 319, p. 237-246, 2006.

PECOT-DECHAVASSINE, M. Synaptic vesicle openings captured by cooling and related to transmitter release at the frog neuromuscular junction. **Biology of the cell**, v. 46, p. 43-50, 1982.

PERIN, M. S.; FRIED, V. A.; MIGNERY, G. A.; JAHN, R.; SUDHOF, T. C. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. **Nature**, v. 345, p. 260-263, 1990.

PFENNINGER, K.; SANDRI, C.; AKERT, K.; EUGSTER, C. H. Contribution to the problem of structural organization of the presynaptic area. **Brain Res.**, v. 12, p. 10-18, 1969.

POSKANZER, K. E. & DAVIS, G. W. Mobilization and fusion of a non-recycling pool of synaptic vesicles under conditions of endocytic blockade. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 714-723, julho de 2004.

POTHOS, E. N.; LARSEN, K. E.; KRANTZ, D. E.; LIU, I. J.; HAYCOCK, J. W.; SETLIK, W. *et al.* **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 7297-7306, 2000.

PRADO, M. A.; SANTOS, T. M.; GOMEZ, M. V. The effect of 2-(4-phenylpiperidino)cyclohexanol (AH-5183), tityustoxin and ouabain on the release of acetylcholine and its mobilization from cytoplasmic and vesicular pools of rat brain cortical slices. **Neurosci. Lett.**, v. 111, p. 195-200, 1990.

PRADO, M. A. M.; REIS, R. A. M.; PRADO, V. F.; MELLO, M. C.; GOMEZ, M. V.; MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, v. 41, p. 291-299, nov. 2002.

PRADO, V. F.; SILVA, C. M.; CASTRO, B. M.; LIMA, R. F.; BARROS, D.; AMARAL, E. A.; RAMSEY, A. J. *et al.* Mice Deficient for the Vesicular Acetylcholine Transporter Are Myasthenic and Have Déficits in Object and Social Recognition. **Neuron**, v. 51, p. 601-612, 2006.

PRIOR, C.; MARSHALL, I. G.; PARSONS, S. M. The pharmacology of vesamicol: an inhibitor of the vesicular acetylcholine transporter. **General Pharmacology**, v. 23, p. 1017-1022, 1992.

PUMPLIN, D. W., REESE, T. S.; LLINÁS, R. Are the presynaptic membrane particles the calcium channels? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 78, p. 7210-7213, 1981.

PYLE, J. L.; KAVALALI, E. T.; PIEDRAS-RENTERIA, E. S.; TSIEN, R. W. Rapid reuse of readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. **Neuron**, v.28, p. 221-231, out. 2000.

REIMER, R. J.; FON, E. A.; EDWARDS, R. H. Vesicular neurotransmitter transport and the presynaptic regulation of quantal size. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 8, p. 405-412, 1998.

REIST, N. E.; BUCHANAN, J.; LI, J.; DIANTONIO, A.; BUXTON, E. M.; SCHWARZ, T. L. Morphologically docked synaptic vesicles are reduced in synaptotagmin mutants of *Drosophila*. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 7662-7673, 1998.

RICHARDS, D. A.; GUATIMOSIM, C.; BETZ, W. J. Two Endocytic Recycling Routes Selectively Fill Two Vesicle Pools in Frog Motor Nerve Terminals. **Neuron**, v. 27, p. 551-559, set. 2000.

RICHARDS, D. A.; GUATIMOSIM, C.; RIZZOLI, S. O.; BETZ, W. J. Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. **Neuron**, v. 39, p. 529-541, jul. 2003.

RIZZOLI, S. O.; RICHARDS, D. A.; BETZ, W. J. Monitoring synaptic vesicle recycling in frog motor nerve terminals with FM dyes. **J. Neurocytol.**, v. 32, p. 539-549, 2003.

RIZZOLI, S. O.; RICHARDS, D. A.; BETZ, W. J. The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. **Science**, v. 303, p. 2037-2039, 2004.

RIZZOLI, S. O. & BETZ, W. J. Synaptic Vesicle Pools. **Nature Reviews/ Neuroscience**, v. 6, p. 57-69, jan. 2005.

ROOS, J. & KELLY, R. B. The endocytic machinery in nerve terminals surrounds sites of exocytosis. **Curr. Biol.**, v. 9, p. 1411-1414, 1999.

ROYLE, S. G. & LAGNADO L. Endocytosis at the synaptic terminal. **The Journal of Physiology**, v. 553, n. 2, p. 345-355, 2003.

RUDNICK, G. Ion coupled neurotransmitter transport: Thermodynamics vs. kinetic determinations of stoichiometry. **Methods Enzimol**, v. 296, p. 233-247, 1998.

RYAN, T. A. & SMITH, S. J. Vesicle pool mobilization during action potential firing at hippocampal synapses. **Neuron**, v. 14, p. 983-989, 1995.

RYAN, T. A.; SMITH, S. J.; REUTER, H. The timing of synaptic vesicle endocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 5567-5571, 1996.

SCHERMAN, D. & HENRY, J. P. Effects of drugs on the ATP-induced and pH gradient-driven monoamines transport by bovine chromaffin granules. **Biochem. Pharmacol.**, v. 29, p. 1883-1890, 1980.

SEARL, T.; PRIOR, C.; MARSHALL, I. G. The effects of L-vesamicol, an inhibitor of vesicular acetylcholine uptake, on two populations of miniature endplate currents at the snake neuromuscular junction. **Neuroscience**, v. 35, p. 145-156, 1990.

SEARL, T.; PRIOR, C.; MARSHALL, I. G. Acetylcholine recycling and release at rat motor nerve terminals studied using (-)-vesamicol, and troxypriolium. **J. Physiol. (London)**, v. 444, p. 99-116, 1991.

SMITH, D. O. Sources of adenosine released during neuromuscular transmission in the rat. **J. Physiol. (London)**, v. 432, p. 343-354, 1991.

SONG, H.; MING, G.; FOX, E.; BELLOCCHIO, E.; EDWARDS, R. H.; POO, M. Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. **Neuron**, v. 18, p. 815-826, 1997.

STOBRAWA, S. W.; BREIDERHOFF, T.; TAKAMORI, S.; ENGEL, D.; SCHWEIZER, M.; ZDEBIK, A. A. *et al.* Disruption of CLC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. **Neuron**, v. 29, p. 185-196, 2001.

SÜDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle revisited. **Neuron**, v. 28, p. 317-320, 2000.

SÜDHOF, Thomas C. The Synaptic Vesicle Cycle. **Annual Review of Neuroscience**, v.27, p. 509-547, 2004.

TAKAMORI, S.; HOLT, M.; STENIUS, K.; LEMKE, E. A.; GRONBORG, M.; RIEDEL, D. *et al.* Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. **Cell**, v. 127, p. 831-846, nov. 2006.

TAKEI, K.; MUNDIGL, O.; DANIELL, L.; DE CAMILLI, P. The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. **The Journal of Cell Biology**, v. 133, p. 1237-1250. jun.1996.

TAKEI, K.; SLEPNEV, V. I.; HAUCKE, V.; DE CAMILLI, P. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. **Nat. Cell Biol.**, v. 1, p. 33-39, 1999.

TOLL, L. & HOWARD, B. D. Evidence that an ATPase and a protonmotive force function in the transport of acetylcholine into storage vesicles. **J. Biol. Chem.**, v. 255, p. 1787-1789, 1980.

TORRI-TARELLI, F.; GROHOVAZ, F.; FESCE, R.; CECCARELLI, B. Temporal coincidence between synaptic vesicle fusion and quantal secretion of acetylcholine. **J Cell Biol.**, v. 101, p. 1386-1399, 1985.

VAN DER KLOOT, W. 2-(4-Phenylpiperidino) cyclohexanol (AH5183) decreases quantal size at the frog neuromuscular junction. **Pflugers Archiv**, v. 406, p. 83-85, 1986.

VAN DER KLOOT, W. Inhibition of packing of acetylcholine into quanta by ammonium. **FASEB J.**, v. 1, p. 298-302, 1987.

VAN DER KLOOT, W. Nicotinic Agonists Antagonize Quantal Size Increases and Evoked Release at Frog Neuromuscular Junction. **Journal of Physiology**, v. 468, p. 567-589, 1993.

VAN DER KLOOT, W. & MOLGÓ, J. Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 899-991, 1994.

VAN DER KLOOT, W.; COLASANTE, C.; CAMERON, R.; MOLGÓ, J. Recycling and refilling of transmitter quanta at the frog neuromuscular junction. **Journal of Physiology**, v. 523, p. 247-258, 2000.

VAN DER KLOOT, W. A chloride channel blocker reduces acetylcholine uptake into synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. **Brain Research**, v. 961, p. 287-289, jan. 2003.

VON POSER, C.; ZHANG, J. Z.; MINEO, C.; DING, W.; YING, Y.; SUDHOF, T. C. *et al.* Synaptotagmin regulation of coated pit assembly. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 30916-30924, 2000.

WHITTON, P. S.; MARSHALL, I. G.; PARSONS, S. M. Reduction of quantal size by vesamicol (AH5183), an inhibitor of vesicular acetylcholine storage. **Brain Research**, v. 385, p. 189-192, 1986.

WIGHTMAN, R. M.; SCHROEDER, T. J.; FINNEGAN, J. M.; CIOLKOWSKI, E. L.; PHIEL, K. Time course of release of catecholamines from individual vesicles during exocytosis at adrenal medullary cells. **Biophys. J.**, v. 68, p. 383-390, 1995.

WILKINSON, R. S. & COLE, J. C. Resolving the Heuser - Ceccarelli debate. **Trends Neurosci.**, v. 24, p. 195-197, 2001.

WILLIAMSON, L. C. & NEALE, E. A. Bafilomycin A1 inhibits the action of tetanus toxin in spinal cord neurons in cell culture. **J. Neurochem.**, v. 63, p. 2342-2345, 1994.

WILSON, N. R.; KANG, J.; HUESKE, E. V.; LEUNG, T.; VAROQUI, H.; MURNICK, J. G. *et al.* Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT₁. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 6221-6234, 2005.

WINKLER, H. & CARMICHAEL, S. W. The cromaffin granule. Poisner, A. M.; Trifaro, J. M., eds. The secretory granule. Amsterdam: Elsevier; p. 81-118, 1982.

WOJCIK, S. M.; RHEE, J. S.; HERZOG, E.; SIGLER, A.; JAHN, R.; TAKAMORI, S. *et al.* An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 7158-7163, 2004.

YOO, S. H. pH and Ca^{+2} - dependent aggregation property of secretory vesicle matrix proteins and the potential role of chromogranin A and B in secretory vesicle biogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 1558-1565, 1996.

ZHANG, J. Z.; DAVLETOV, B. A.; SUDHOF, T. C.; ANDERSON, R. G. Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling. **Cell**, v. 78, p. 751-760, 1994.

ZHANG, B.; KOH, Y. H.; BECKSTEAD, R. B.; BUDNIK, V.; GANETZKY, B.; BELLEN, H. J. Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. **Neuron**, v. 21, p. 1465-1475, 1998.

ZHOU, Q.; PETERSEN, C. C., H.; NICOLL, R. A. Effects of reduced vesicular filling on synaptic transmission in rat hippocampal neurons. **Journal of Physiology**, v. 525, p. 195-206, 2000.

ZIMMERMANN, H. & WHITTAKER, V. P. Effect of electrical stimulation on the yield and composition of synaptic vesicles from the cholinergic synapses of the electric organ of *Torpedo*: a combined biochemical, electrophysiological and morphological study. **Journal of Neurochemistry**, v. 22, p. 435-450, 1974.