

Bento João da Graça Azevedo Abreu

**Modulação do pH Intravesicular e Tráfego de Vesículas
Sinápticas em Neurônios Bipolares da Retina**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte 2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Bento João da Graça Azevedo Abreu

**Modulação do pH Intravesicular e Tráfego de Vesículas
Sinápticas em Neurônios Bipolares da Retina**

**Tese submetida ao Programa de
Pós-graduação em Biologia
Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para a obtenção
do grau de Doutor em Ciências.**

Orientadora: Cristina Guatimosim Fonseca

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia
Pós-Graduação em Biologia Celular
Belo Horizonte 2008**

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).

*“Acredite nos que buscamos a verdade,
duvide dos que já a encontraram...”*

Parte dos resultados desta tese foi apresentada no seguinte encontro:

Biannual Neuroscience Meeting- Innsbruck, Áustria/2005.

Pôster: Visualizing Synaptic Vesicle Acidification in Retinal Bipolar Neurons.

Bento J. Abreu, Maila Guimarães, Livia C. Uliana, Jozsef Vigh, Henrique von Gersdorff, Marco A. Prado, Cristina Guatimosim.

Esta tese gerou os seguintes trabalhos:

“PKC modulates synaptic vesicle acidification in a ribbon type nerve terminal in the retina”.

Bento J. Abreu, Maila Guimarães, Livia C. Uliana, Jozsef Vigh, Henrique von Gersdorff, Marco A. Prado, Cristina Guatimosim.

Periódico: Neurochemistry International/ 2008

“The role of intracellular chloride in mediating vesicular acidification and glutamate filling at the bipolar cell terminal”. (em preparação).

Jozsef Vigh, Bento J. Abreu, Marco. A. Prado, Cristina Guatimosim and Henrique Von Gersdorff

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Bento e Sônia, por me apoiarem incondicionalmente nos momentos difíceis. Tenho muito orgulho de vocês, de vossa história e de vossos princípios e espero que algum dia possa orgulhá-los da mesma maneira.

Ao meu irmão, Luís Francisco, que está distante mas que sempre nos apóia com muito carinho e atenção.

À Mila, minha namorada, obrigado pelo amor e paciência.

À minha orientadora, Cristina Guatimosim, pelos ensinamentos.

Aos meus amigos do laboratório: Ernani Amaral, Lívia Uliana, Débora Lopes, Monalise Costa, Maíla Guimarães, Luciana Ferreira, Grazielle e Hermann.

Aos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia: Célio de Castro, Fabiana, Cristina Martins, Ana Cristina, Vinícius, Adriane, Jomara, Bráulio, Xavier, Danuza, Cristiane...

Aos amigos da Pós-Graduação em Biologia Celular: Iraídes, Germano, Andréa, Thales, Érica, Fernando e Ricardo. Aos amigos do QueijosMaravilha e a turma da Fisioterapia. Bons momentos...

Aos professores Marco Antônio Prado, Marcos Vinícius Gómez, Gregory Kitten, Aristóbolo Mendes, Elizabeth Ribeiro, Ana Maria Ravaro, Silvia Guatimosim.

Às agências financiadoras e a todos outros que participaram de alguma maneira deste trabalho, muito obrigado!

Sumário

| | |
|---|-----|
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xii |
| RESUMO..... | xiv |
| ABSTRACT..... | xv |
| I. Introdução..... | 1 |
| I.I. Aspectos básicos da neurotransmissão..... | 1 |
| I.I.a. A Comunicação Neuronal e o Terminal Pré- Sináptico..... | 1 |
| I.I.b. O Ciclo da Vesícula Sináptica..... | 2 |
| I.II. Acidificação das Vesículas..... | 09 |
| I.II.a. H ⁺ V-ATPases X pH intravesicular..... | 09 |

| | |
|---|----|
| I.II.b. Canais vesiculares de cloreto X pH intravesicular..... | 12 |
| I.III. Transportadores Vesiculares de Glutamato..... | 13 |
| I.IV. Transmissão Glutamatérgica..... | 17 |
| I.V. A Retina | 20 |
| I.V.a. Histologia e Fisiologia Básica da Retina..... | 20 |
| I.V.b. As células Bipolares da Retina..... | 25 |
| I.V.c. Fitas Sinápticas..... | 26 |
| I.VI. Proteínas Cinases e Fosfatases X Neurotransmissão..... | 29 |
| II. Justificativa e relevância..... | 32 |
| III. Objetivos..... | 34 |
| III.I. Objetivo Geral..... | 34 |
| III.II. Objetivos Específicos..... | 34 |

| | |
|--|----|
| IV. Metodologia..... | 35 |
| IV.I. Drogas e Químicos..... | 36 |
| IV.II. Obtenção de Células Bipolares..... | 36 |
| IV.III. Imageamento da Fluorescência da Acidificação de Vesículas Sinápticas..... | 37 |
| IV.IV. Monitoramento e Imageamento com FM1-43..... | 40 |
| IV.V. Análise de Imagens..... | 44 |
| IV.VI. Análise Estatística..... | 45 |
| V. Resultados..... | 46 |
| V.I. Marcação de Neurônios bipolares com LysoTracker..... | 46 |
| V.II. Inibição de Proteínas Fosfatases Aumenta a Marcação de LysoTracker em Células Bipolares..... | 52 |
| V.III. PKA e CaMKII não Modificam a Marcação de LysoTracker em Neurônios Bipolares..... | 56 |

| | |
|--|-----|
| V.IV. A Ativação de PKC aumenta a fluorescência de LysoTracker em Terminais de Células Bipolares..... | 60 |
| V.V. A Ativação de PKC aumenta a fluorescência de LysoSensor em Neurônios Bipolares..... | 64 |
| V.VI. Alterações na Acidificação e Conteúdo de Neurotransmissores em Vesículas Sinápticas não Interferem com o Tráfego Vesicular Normal..... | 69 |
| VI. Discussão..... | 74 |
| VI.I. PKC modula a acidificação de vesículas sinápticas em terminais de neurônios bipolares..... | 74 |
| VI.II. Possíveis alvos de PKC no terminal de Células Bipolares..... | 78 |
| VI.III. Tráfego de Vesículas Sinápticas em Condições que Alteram o Gradiente Próton-Eletroquímico..... | 80 |
| VII. Conclusão..... | 87 |
| VIII. Referências Bibliográficas..... | 88 |
| IX. Anexos..... | 112 |

Lista de Figuras

| | |
|----------------|-----------|
| Figura 01..... | página 16 |
| Figura 02..... | página 24 |
| Figura 03..... | página 28 |
| Figura 04..... | página 43 |
| Figura 05..... | página 48 |
| Figura 06..... | página 51 |
| Figura 07..... | página 55 |
| Figura 08..... | página 58 |
| Figura 09..... | página 59 |
| Figura 10..... | página 62 |
| Figura 11..... | página 63 |
| Figura 12..... | página 65 |

Figura 13.....página 66

Figura 14.....página 68

Figura 15.....página 71

Figura 16.....página 73

Lista de Abreviaturas

| | |
|-------------|--|
| ACh..... | Acetilcolina |
| AMPA..... | α -amino-3-hidroxi-5-metil 4-isoxazole ácido propiônico |
| BNP1..... | transportador cerebral específico de fosfato inorgânico dependente de Na ⁺ do tipo 1 |
| CA..... | Ciclosporina A |
| Calic..... | Caliculina A |
| CALP..... | Calphostin C |
| CLC..... | Canais para Cloreto |
| Dic..... | Contraste por Interferência Diferencial |
| DMSO..... | Dimetil sulfóxido |
| FM1-43..... | N-(3-trietilamônio-propil)- 4-4(dibutilamino)-éster) piridinium dibrometo |
| GFP..... | Proteína Fluorescente Verde |
| KN93..... | (2-[N-(2-hidroxietil)] (4-metoxi-benzenesulfonyl)] amino-N-(4-clorocinamil)-N-metilbenzilamina) |
| LS..... | LysoSensor Green® |
| LT..... | LysoTracker Red® |
| JNM..... | Junção Neuromuscular |
| MEPPS..... | Potenciais da placa motora em Miniatura |
| mGLUR..... | Receptor Metabotrópico de Glutamato |
| NMDA..... | N-metil-D-aspartato |
| PF..... | Células Parafoliculares |
| PMA..... | Forbol 12-miristato 13-acetato |

| | |
|-----------------------------|---|
| RP-cAMP..... | Rp-Adenosina 3',5'-cíclico monofósforotioato trietilamônio sal hidrato |
| SP-cAMP..... | Adenosina-3',5'-cíclico monofósforotioato acetoximetil éster |
| SpH..... | Sinapto-pHluorina |
| STAU..... | Staurosporina |
| VGLUT..... | Transportador Vesicular de Glutamato |
| VS..... | Vesículas Sinápticas |
| $\Delta\mu\text{H}^+$ | Gradiente Próton-eletroquímico |
| $\Delta\Psi$ | Componente Elétrico do Gradiente Próton-eletroquímico |
| ΔpH | Componente Químico do Gradiente Próton-eletroquímico |
| 4 α -PMA4..... | α -phorbol 12-miristato 13-acetato |

Resumo

O acúmulo de neurotransmissores em vesículas sinápticas ocorre por meio da geração do gradiente próton-eletroquímico ($\Delta\mu\text{H}^+$) que possui dois componentes: o gradiente químico (ΔpH , correspondente à acidez interna) e o componente elétrico através da membrana vesicular ($\Delta\Psi$, carga positiva internamente). $\Delta\mu\text{H}^+$ é gerado pelas bombas de prótons H^+ V-ATPases as quais são responsáveis pela acidificação e estabelecimento das cargas positivas no lúmen vesicular. Em nosso estudo, investigamos a modulação da acidificação vesicular utilizando a sonda específica para organelas ácidas, LysoTracker (LT), e a sonda sensível ao pH, LysoSensor (LS), em terminais Mb1 de células bipolares da retina de peixes-dourados. Sabendo-se que a fosforilação de proteínas pode modular a acidificação de grânulos secretórios em células neuroendócrinas, investigamos se drogas que afetam proteínas cinases e fosfatases podem alterar a marcação de LT em terminais celulares. Demonstramos que inibidores de fosfatases produzem um aumento da fluorescência de LT, o que nos levou a testar se ativadores de cinases também alteram a fluorescência de LT. Observamos então que ativação de PKC, mas não de PKA e CaMKII, aumentava a fluorescência de LT, sugerindo que PKC poderia modular a acidificação de vesículas sinápticas. Utilizando a sonda pH-dependente LS, foi demonstrado que o ativador de PKC, PMA, induziu um grande aumento na fluorescência de LS enquanto o análogo inativo de PMA, 4 α -PMA foi ineficaz em produzir os mesmos efeitos. O aumento da fluorescência de LS adquirido por PMA foi bloqueado por inibidores de PKC, Calphostin C e Staurosporina. Investigamos também se alterações na acidificação vesicular as quais, sabidamente, interferem com a internalização e armazenamento de neurotransmissores, podem afetar o tráfego de vesículas sinápticas. Utilizando-se a sonda FM1-43, não detectamos alterações significativas no ciclo de vesículas em condições experimentais nas quais as vesículas estão com conteúdo de neurotransmissores reduzido ou abolido. Os resultados de nosso trabalho demonstram que a fosforilação de PKC aumenta a acidificação vesicular, o que pode modular a retenção de glutamato em vesículas; e que o tráfego destas organelas não é afetado quando há défices na acidificação e preenchimento de vesículas.

Abstract

The driving force for neurotransmitter accumulation into synaptic vesicles is provided by the generation of a transmembrane electrochemical gradient ($\Delta\mu\text{H}^+$) that has two components: a chemical gradient (ΔpH , inside acidic) and an electrical potential across the vesicular membrane ($\Delta\Psi$, inside positive). This gradient is generated in situ by the electrogenic vacuolar H^+ -ATPase, which is responsible for the acidification and turning the vesicle lumen positive. Here, we investigated modulation of vesicle acidification by using the acidic-organelle probe LysoTracker (LT) and the pH-sensitive probe LysoSensor (LS) at goldfish Mb-type bipolar cell terminals. Since phosphorylation can modulate secretory granule acidification in neuroendocrine cells, we investigated if drugs that affect protein kinases modulate LT staining of cell terminals. We found that PKC activation, but not PKA or CaMKII induced an increase in LT-fluorescence. Using a pH-dependent fluorescent dye (LS) we showed that the PKC activator, PMA, induced an increase in LS-fluorescence whereas the inactive analog 4 α -PMA was unable to cause the same effect. This increase induced by PMA was blocked by PKC inhibitors, Calphostin C and Staurosporine. We used the fluorescent probe FM1-43 to monitor the synaptic vesicle cycle when vesicles were not acidic and full-filled with neurotransmitters. We did not detect any significant differences between control and experimental conditions. The results above suggest that phosphorylation by PKC may increase synaptic vesicle acidification in retinal bipolar cells and therefore has the potential to modulate glutamate retention inside synaptic vesicles. Further, transport of neurotransmitter into recycled glutamatergic vesicles and acidification mechanisms are not a requirement for repeated cycles of exocytosis and retrieval of synaptic vesicle membrane during prolonged stimulation of bipolar nerve terminals.

I. Introdução

I.I. Aspectos básicos da neurotransmissão

I.Ia. A Comunicação Neuronal e o Terminal Pré-Sináptico

Os bilhões de neurônios do sistema nervoso central de mamíferos oferecem uma quantidade incalculável de possibilidades de formação de completas redes de comunicação neuronal. Áreas de associação corticais recebem informação de diversas áreas sensoriais as quais, por sua vez, geram atividades tão importantes como o pensamento abstrato, a memória e a consciência, entre outras. Desde as primeiras descobertas de Ramón y Cajál (1852-1934), sabe-se que o cérebro não é uma rede contínua e que cada neurônio funciona como um elemento individual o qual se comunica com outros neurônios através de zonas especializadas do terminal sináptico celular denominadas, por Sherrington em 1897, de sinapses. A maioria dos neurônios forma centenas de terminações nervosas as quais são comumente separadas dos corpos celulares neuronais e que funcionam como máquinas secretórias capazes de realizar repetidos ciclos de liberação de neurotransmissores. Veremos, a seguir, algumas estruturas responsáveis pelo processamento desse mecanismo.

O botão ou terminal pré-sináptico é uma porção especializada do axônio que pode ser caracterizada pela presença de zonas ativas e de vesículas

sinápticas (VS). A zona ativa é uma região do terminal pré-sináptico que se encontra em íntimo contato com a membrana pós-sináptica, formando a sinapse, e diretamente em aposição à fenda sináptica. Possui uma aparência elétron-densa na microscopia eletrônica de transmissão, refletindo a presença de uma malha protéica, na qual vesículas ancoradas estão mantidas (Pfenninger et al., 1969). Deve-se salientar que canais de cálcio e proteínas t-SNAREs (as quais mencionaremos posteriormente) compõem as zonas ativas (revisado por Murthy & De Camilli, 2003).

As VS ancoradas na zona ativa representam uma pequena fração do total de vesículas presentes no terminal (De Camilli et al., 2001). A formação desse aglomerado de vesículas ocorre antes da formação sináptica, e já está presentes em axônios em desenvolvimento que se dirigem para seus contatos específicos (Zhai et al., 2001). Actina presente nas proximidades desse aglomerado vesicular possivelmente previne dispersão das VS pelo terminal sináptico (Shupliakov et al., 2002).

I.Ib. O Ciclo da Vesícula Sináptica

Todas as funções pré-sinápticas, diretamente ou indiretamente, envolvem a VS. As vesículas são organelas de aproximadamente 40 nm de diâmetro, possuindo uma diversidade surpreendente de proteínas e, com exceção das bombas próton ATPases vacuolares (H^+ V-ATPase) que estão presente apenas em uma ou duas cópias, contêm numerosas cópias de proteínas essenciais para o tráfego de membrana e captação de neurotransmissores (Takamori et al., 2006). 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). O tráfego dessas vesículas no terminal pré-sináptico, a fim de promover a liberação de neurotransmissores, pode ser dividido nas seguintes sequências: Primeiramente, neurotransmissores devem ser ativamente transportados para o interior das VS (1); vesículas aglomeram-se em justaposição às zonas ativas (2); VS ancoram-se nas zonas ativas (3); onde sofrem amadurecimento ou *priming* (4), sendo convertidas, portanto, a um estado de competência para a abertura do poro de fusão disparado por cálcio (5) e a consequente liberação de neurotransmissores (revisado por Sudhof, 2004).

Mesmo em repouso, as sinapses possuem uma finita e baixa probabilidade de liberação de neurotransmissores, causando exocitose espontânea (ou constitutiva), o que pode ser refletido como potenciais da placa motora em miniatura (MEPPs) em mensurações eletrofisiológicas (Katz & Miledi, 1969). Porém, o grande evento desencadeador da rápida liberação de neurotransmissores ocorre pelo influxo de cálcio (Ca^{2+}) através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem após a despolarização. A rápida resposta desencadeada pelo Ca^{2+} sugere uma mudança conformacional de um complexo pré-fusão, ou seja, a exocitose dependente de Ca^{2+} reflete a ação de sensores de Ca^{2+} para o desencadeamento da fusão das VS na membrana pré-sináptica. Sinaptotagmina é uma proteína seletivamente abundante em VS e é tida como o principal sensor de Ca^{2+} que controla a fusão de vesículas. Isto devido à presença de dois domínios C2, motivos responsáveis pela ligação a íons Ca^{2+}

em várias proteínas (Chapman, 2002; Stevens, 2003; Jackson & Chapman, 2008). De fato, na ausência de sinaptotagmina do tipo I, há um severo defeito na liberação sincrônica de vesículas dependente de Ca^{2+} e estas organelas são liberadas de forma assincrônica (exocitose constitutiva) por meio de um mecanismo independente de Ca^{2+} (Geppert et al., 1994).

Dessa maneira, a exocitose de VS é disparada por aumentos de Ca^{2+} na ordem de 100 μM nas zonas ativas e as sinaptotagminas do tipo I e II são as responsáveis pela ligação ao Ca^{2+} nessas altas concentrações em sinapses centrais (Fox & Sanes, 2007). No entanto, em fotorreceptores e células bipolares da retina, concentrações de 1 μM de Ca^{2+} já produzem liberação tônica de transmissores o que sugeria a existência de um alternativo sensor de Ca^{2+} de alta afinidade nessas sinapses. Visando elucidar essa questão, Berntson e Morgans (2003), através de técnicas de imunomarcção, não demonstraram marcação imunofluorescente para as sinaptotagminas I e II, mas sim para a sinaptotagmina de alta afinidade do tipo III em células bipolares da retina de peixes-dourados. Esta sinaptotagmina, inclusive, colocalizava-se com a proteína cinase do tipo C a qual é abundantemente encontrada em terminais de células bipolares. Os resultados encontrados indicam que, diferentemente das células bipolares da retina em mamíferos, a exocitose de VS em células bipolares e fotorreceptores da retina de peixes-dourados é mediada pelo sensor de Ca^{2+} de alta afinidade (Berntson e Morgans, 2003).

O trabalho pioneiro de Söllner e colaboradores (1993) demonstrou, *in vitro*, que para o estabelecimento de fusão entre membranas é necessária a

participação de pequenas proteínas transmembrânicas denominadas SNAREs. Para a exocitose de VS, as SNAREs relevantes são sinaptobrevina/VAMP (v-SNARE; presentes na membrana das VS), syntaxina 1 e SNAP25 (t-SNAREs; presentes na membrana plasmática do terminal sináptico). As v-SNARE e t-SNARE possuem domínios helicoidais característicos e quando ocorre interação entre esses complexos protéicos, esses domínios se entrelaçam, estabelecendo complexos trans SNAREs estáveis os quais mantêm as membranas vesicular e plasmática próximas. Assim, as SNAREs representam a maquinaria mínima para a fusão de membranas (Weber et al., 1998), hipótese reforçada pelo fato de que toxinas botulínica B e tetânica, metaloproteases específicas para VAMP, bloqueiam totalmente a liberação de neurotransmissores (Rothman, 1990; Schiavo et al., 1997). Os complexos SNARE devem ser desmontados por NSF através da hidrólise de ATP. Caso haja bloqueio da ação de NSF, ocorre acumulação de vesículas incompetentes à fusão resultando em progressiva perda de proteínas SNAREs disponíveis para a formação dos complexos trans SNAREs (Söllner et al., 1993).

De forma resumida, a comunicação neuronal ocorre através de transferências de sinais a junções sinápticas pela exocitose de VS repletas de neurotransmissores (Katz & Miledi, 1965). Esse processo é mediado por Ca^{2+} (Zucker, 1996) e os transmissores neurais liberados na fenda sináptica atuarão em receptores pré ou pós-sinápticos específicos. A ligação dos neurotransmissores causa excitação ou inibição da atividade elétrica em seus alvos em neurônios centrais (Ryan & Reuter, 2001) constituindo, assim, a base da comunicação entre neurônios.

A fim de se evitar depleção de vesículas e consequente interrupção da transmissão sináptica num estímulo continuado, por exemplo, excesso de membrana e de proteínas vesiculares no terminal pré-sináptico devem ser recuperados (Heuser & Reese, 1973; De Camilli & Takei, 1996) e reciclados para que possam ser novamente utilizados em um novo ciclo sináptico. A importância desse processo pode ser observada em mutantes *Shibire* da mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*), os quais exibem um defeito da GTPase dinamina em temperaturas não permissivas, causando paralisia da transmissão por esgotamento das vesículas do pool de liberação rápida (Kosaka & Ikeda, 1983).

Embora não se saiba exatamente como é reciclado o excesso de membrana no terminal sináptico, três mecanismos básicos de endocitose podem operar: (1) endocitose de vesículas revestidas por capa de clatrina, (2) endocitose de grandes extensões de membrana e a (3) endocitose denominada “Kiss and Run”.

O primeiro modo é o melhor compreendido e envolve fusão completa da vesícula na membrana do terminal e reciclagem via capa de clatrina e em locais distantes das zonas de fusão, passando ou não por compartimentos endossomais e através de várias moléculas relacionadas ao processo (Heuser & Reese, 1973; Cremona & De Camilli, 1997). Resumidamente, após estimulação despolarizante, moléculas adaptadoras (AP2 e 180) ligam-se à proteínas de superfície da membrana plasmática, recrutando triskélions de clatrina os quais produzem um abaulamento da membrana do terminal. A formação da capa de clatrina leva à invaginação da membrana em forma de

vesículas e, subseqüentemente, a GTPase dinamina executa a fissão desse complexo. No citossol, a capa de clatrina é removida da vesícula e esta pode também fundir-se com estruturas endossomais (Takei et al., 1996; Royle & Lagnado, 2003).

A endocitose de grandes extensões de membrana foi consistentemente observada em vários tipos celulares (Fried & Blaustein, 1978; Takei et al., 1996; Teng et al., 1999; Richards et al., 2000), inclusive em células ou neurônios bipolares da retina de peixe dourado, e ocorre em locais distantes das zonas de fusão via invaginações de largas cisternas através da polimerização de actina e sem envolvimento direto de clatrina. Acredita-se que essa forma de endocitose compensatória possa estar envolvida na plasticidade funcional e estrutural do terminal sináptico da célula bipolar (Holt et al., 2003).

E, por último, temos a endocitose denominada poeticamente de “Kiss and Run” na qual neurotransmissores são liberados das vesículas através de um poro de fusão sem que haja fusão completa da vesícula com a membrana do terminal (Ceccarelli et al., 1973; Valtorta et al., 2001). Após esse evento, a vesícula destaca-se da membrana e retorna ao citossol sem perder sua integridade e morfologia originais.

Após a reciclagem, as vesículas são amadurecidas através da acidificação de seu lúmen, recarregadas com neurotransmissores e posteriormente são translocadas para diferentes regiões dos terminais sinápticos formando “pools” vesiculares. Apesar de existir uma grande quantidade de nomes, podemos definir 3 tipos básicos de aglomerados ou “pools” vesiculares em praticamente

todas as sinapses: O aglomerado de liberação rápido compreende uma pequena parcela de VS (cerca de 1-2 % do total de VS) que estão imediatamente disponíveis sob estimulação. Estas vesículas são competentes à fusão e se encontram ancoradas na zona ativa (Pieribone et al., 1995; Pyle et al., 2000). O segundo aglomerado vesicular ou pool de reciclagem sustenta a liberação de vesículas sob estimulação moderada fisiológica (Richards et al., 2003) e corresponde à aproximadamente 5-20 % do número total das VS do terminal. Já o pool de reserva é conhecido como um grande depósito de VS as quais somente são liberadas sob intensa estimulação (Delgado et al., 2000; Richards et al., 2003).

Finalmente, para recomeçarem um novo ciclo sináptico, as VS devem ser preenchidas por neurotransmissores através de transportadores vesiculares específicos, usando para esse fim, a força gerada pela bomba de prótons- H^+ V-ATPase . Este passo de captação de neurotransmissores e acidificação de VS será explanado com mais detalhes a seguir.

I.III. Acidificação das Vesículas

I.IIIa. H⁺ V-ATPases X pH intravesicular

Embora pouco estudada, a acidificação de vesículas tem um importante papel no processamento, degradação e tráfego de proteínas (Smythe & Warren, 1991). Em princípio, a reacidificação de VS pós-endocitose poderia influenciar a plasticidade sináptica de curto prazo por modular a função de proteínas vesiculares envolvidas na exocitose ou simplesmente limitar a velocidade de preenchimento de neurotransmissores nas VS (Atluri & Ryan, 2006). Veremos, portanto, como ocorre esse processo no interior das VS a fim de promover a captação de neurotransmissores.

Utilizando a sonda sinapto-pHluorina (SpH), Sankaranarayanan & Ryan (2000) observaram que vesículas de neurônios hipocâmpais em cultura reacidificam-se numa constante de tempo de poucos segundos. SpH é uma proteína fluorescente verde (GFP) sensível ao pH conjugado ao domínio luminal de VAMP2 nas VS. Em VS acídicas em repouso, a fluorescência de SpH encontra-se bloqueada em cerca de 97 %. Quando as VS sofrem exocitose após estímulo elétrico, SpH acumula-se na membrana plasmática e, em ambiente alcalino, sua fluorescência aumenta aproximadamente 20 vezes. SpH é removido da membrana plasmática durante endocitose de VS e a diminuição da fluorescência corresponde à reacidificação dessas organelas, que demanda de alguns segundos para se processar. De fato, quando essa

preparação é exposta ao potente inibidor de H⁺ V-ATPases, Bafilomicina, ocorre um completo bloqueio da diminuição da fluorescência de SpH durante endocitose (Atluri & Ryan, 2006).

Sendo assim, para que possam mediar a comunicação neuronal, neurotransmissores sintetizados no citoplasma requerem transporte para o interior das vesículas. Esse armazenamento dos neurotransmissores nas vesículas ocorre via transportadores específicos e depende da geração de um gradiente transmembrana de natureza eletroquímica (Liu & Edwards, 1997; Rudnick, 1998).

Esse gradiente é gerado *in situ* pelas H⁺ V-ATPases. Estas bombas de prótons residem em vários compartimentos intracelulares e promovem a acidificação de compartimentos através de um bombeamento de prótons através da membrana, tornando seu lúmen carregado positivamente (Nishi & Forgac, 2002). Esse transportador possui dois domínios: V1 e V0. O domínio V1 é um complexo periférico de 640 kDa constituído por 8 diferentes subunidades e tem como função a hidrólise de ATP. Já o domínio V0 é um complexo integral de 260 kDa composto por 5 subunidades diferentes sendo responsável pela translocação de prótons (Nishi & Forgac, 2002). Ambos setores dependem um do outro para o perfeito funcionamento da H⁺ V-ATPase (Nelson, 1992).

A H⁺ V-ATPase utiliza a energia produzida pela hidrólise do ATP para translocar H⁺ para o lúmen vesicular. O influxo desses prótons estabelece duas condições: uma maior acidificação do interior da vesícula correspondente ao gradiente ou componente químico (ΔpH) através da membrana; e o

desenvolvimento de um componente elétrico ($\Delta\Psi$) devido às cargas positivas internalizadas (vide desenho esquemático na figura 1). O gradiente protoeletroquímico ($\Delta\mu\text{H}^+$) é representado pelo somatório desses dois componentes (Ozkan & Ueda, 1998).

O $\Delta\mu\text{H}^+$ gerado pela H^+ V-ATPase depende da disponibilidade de ânions para neutralizar a carga de prótons. Caso esses ânions não estejam disponíveis, a H^+ V-ATPase irá gerar um gradiente no qual $\Delta\Psi$ predominará sobre ΔpH . Alternativamente, a disponibilidade de ânions neutralizaria a carga de prótons, dissipando $\Delta\Psi$ e resultando num aumento de ΔpH . Embora cloreto esteja presente em baixas concentrações (<10 mM) no citoplasma, vesículas secretórias parecem ter uma condutância de cloreto que permite o desenvolvimento do ΔpH .

Pode-se avaliar a importância desse transportador utilizando a Bafilomicina, que causa um rompimento do $\Delta\mu\text{H}^+$ da membrana vesicular (Drose & Altendorf, 1997) e diminui a amplitude de correntes pós-sinápticas em miniatura (MEPPs) de neurônios (Zhou et al., 2000), além de alterar a acumulação vesicular de uma variedade de neurotransmissores (Roseth et al., 1995).

I.IIIb. Canais vesiculares para cloreto X pH intravesicular

Os canais para cloreto (CLC) intracelulares constituem um ramo da família dos canais de cloreto que é composto por 9 membros. Esses canais intracelulares (CLC-3, 4, 5, 6 e 7) são canais para ânions que permitem a difusão passiva de íons carregados negativamente através de seu gradiente eletroquímico e podem ser encontrados em compartimentos endossomais, VS, grânulos secretórios, lisossomas e vesículas de Golgi onde desempenham funções distintas (Jentsch et al., 2002).

O influxo de cloreto, presente no meio intracelular, por esses canais serviria para neutralizar cargas positivas que são transportadas pela H^+ V-ATPase, possibilitando assim um incremento de transporte desta bomba e, conseqüentemente, maior acidificação vesicular (Jentsch et al., 2002). De fato, observou-se em VS de neurônios cerebrais de camundongos “knock-out” para o gene de CLC-3, um canal presente em endossomas e vesículas, uma diminuição na acidificação de vesículas se comparados a camundongos selvagens (Stobrawa et al., 2001). Como resultado, esses animais apresentaram uma severa neurodegeneração, especialmente da retina e do hipocampo, possivelmente relacionada a alterações no armazenamento e na liberação de neurotransmissores (Stobrawa et al., 2001).

Temos que o transporte de diferentes classes de neurotransmissores depende de componentes distintos do $\Delta\mu H^+$. O transporte de monoaminas e de acetilcolina depende principalmente de mudanças no ΔpH enquanto que o $\Delta\Psi$ é mais importante para o transporte de GABA e glutamato (Stevens & Forgac,

1997). A condutância de cloreto pela vesícula aumentaria o ΔpH às custas de $\Delta\Psi$. Assim, regulando-se os canais para cloreto poderíamos alterar valores dos gradientes elétrico e químico.

I.IV. Transportadores Vesiculares de Glutamato

Utilizamos como modelo experimental de nossa pesquisa neurônios bipolares da retina, células que liberam o neurotransmissor glutamato de forma contínua e sustentada (Tachibana & Okada, 1991), como veremos posteriormente e, portanto, faz-se necessário uma breve revisão sobre os transportadores vesiculares específicos de glutamato- os VGLUTs (vide figura 1).

A proteína responsável pelo carreamento de glutamato nas VS permaneceu desconhecida por muitos anos e quando foi finalmente identificada, constatou-se, surpreendentemente, que essa proteína já havia sido clonada em 1994, mas havia sido distinguida como uma proteína transportadora diferente, originalmente denominada BNP1 (transportador cerebral específico de fosfato inorgânico dependente de Na^+ do tipo 1) (Ni et al., 1994). Diferentemente do que se supõe para transportadores de Na^+ , essa proteína estava predominantemente localizada em VS e não em membranas plasmáticas (Belocchio et al., 1998; Takamori et al., 2000). Além disso, BNP1 era expresso em subpopulações sabidamente glutamatérgicas (Belocchio et al., 1998). Estudos de Takamori et al (2000) e Belocchio et al (2000) demonstraram precisamente que BNP1 não só funciona como um

transportador vesicular de glutamato como também confere um fenótipo glutamatérgico aos neurônios. Sua localização preferencial em VS assim como sua habilidade intrínseca de transportar glutamato sugeriram que a função primordial de BNP1 era o transporte de glutamato para as VS, sendo, portanto, rebatizado como VGLUT1. Outras duas isoformas foram clonadas e funcionalmente caracterizadas em mamíferos (VGLUT2 e 3) (revisado por Takamori, 2006).

Homólogos de VGLUTs já foram identificados em outros organismos tais como *Caenorhabditis elegans*, mosca da fruta, sapo e peixe-zebra; onde o glutamato é preponderantemente utilizado como neurotransmissor da junção neuro-muscular (JNM). Os genes de VGLUT parecem ser evolutivamente conservados em organismos que possuem alguma forma de sinalização glutamatérgica (Takamori, 2006).

Em cérebros de roedores, técnicas de microscopia eletrônica evidenciaram que VGLUT1 e VGLUT2 não apresentam alto grau de colocalização, mas se complementam. VGLUT2 era expresso em neurônios de regiões telencefálicas do bulbo olfatório, região IV do neocórtex, camada granular do giro dentado e outras. VGLUT1, por sua vez, era encontrado em sinapses no tubérculo olfatório, regiões I-III do neocórtex, córtex piriforme, córtex entorrinal, hipocampo, giro dentado e outras regiões (Fremeau et al., 2001; Herzog et al., 2001). Ao contrário das isoformas acima citadas, VGLUT3 apresenta uma distribuição esparsa no sistema nervoso central, não sendo encontrado somente em terminais pré-sinápticos (não classicamente reconhecidos como terminais glutamatérgicos) mas também em somatodendritos de neurônios e astrócitos.

O número de cópias de transportadores vesiculares parece ser um mecanismo que controla a quantidade de moléculas de neurotransmissores nas VS (Pothos et al., 2000; Daniels et al., 2006). Dados na literatura sugerem que a superexpressão de VGLUT (e de outros transportadores vesiculares) aumenta o conteúdo vesicular (Pothos et al., 2000; Wojcik et al., 2004; Daniels et al., 2006) e, da mesma forma, com a diminuição da expressão dessas proteínas há interferência da resposta pós-sináptica e depleção do conteúdo nas vesículas (Fremeau et al., 2004; Wojcik et al., 2004). Interessante notar que nos modelos “knock-out” 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 “knock-outs” para o mesmo transportador que demonstraram que não há diferença na atividade exocítica e endocítica de sinapses do tipo selvagem e “knock-out” para VGLUT1 (Wojcik et al., 2004).

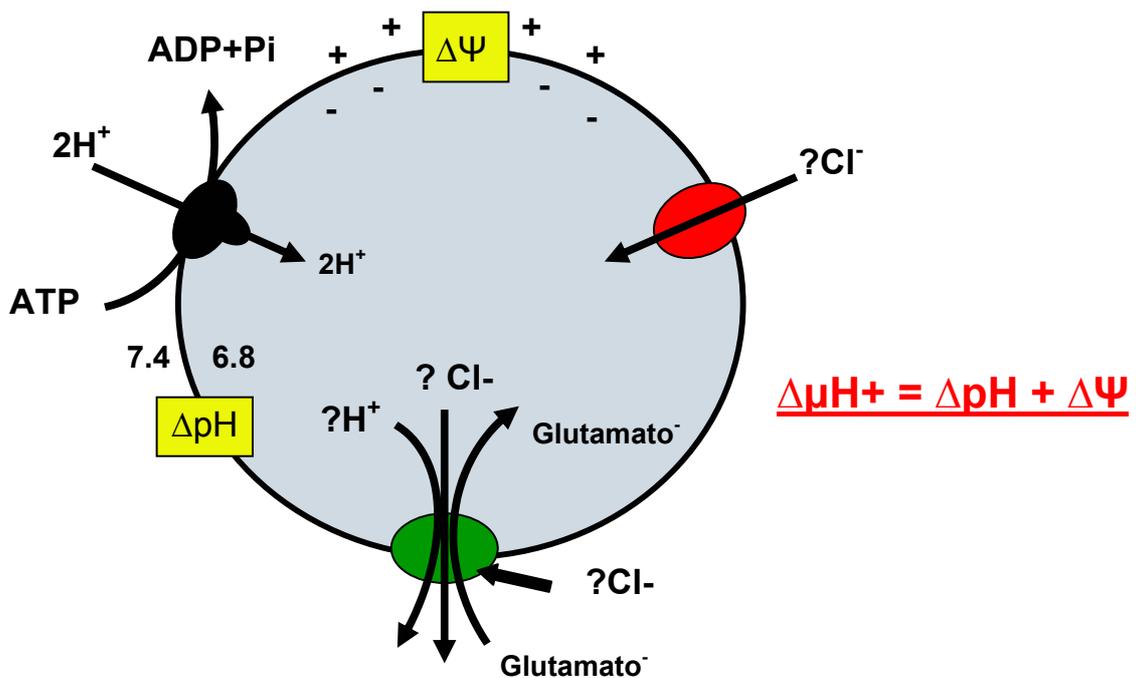


Figura 1: Desenho Esquemático para o Transporte de Glutamato em Vesículas Sinápticas.

O carreador (verde) transporta glutamato para o interior da vesícula (cinza) via o desenvolvimento do gradiente proto-eletrquímico ($\Delta \mu_{H^+} = \Delta pH + \Delta \Psi$) gerado pela H^+ V-ATPase (preto). Os canais de cloreto (vermelho) modulam esse processo através da difusão passiva de ânions. Vários mecanismos do processo de internalização de glutamato ainda não estão elucidados. Adaptado de Ozkan & Ueda, 1998.

I.IV. Transmissão Glutamatérgica

O aminoácido L-glutamato é considerado o principal mediador de sinais excitatórios no sistema nervoso central em mamíferos e está envolvido em várias funções cerebrais incluindo cognição, memória e aprendizado (Headley & Grillner, 1990). Esse transmissor também está relacionado ao acometimento ou perpetuação de várias doenças como encefalopatia hepática, isquemia cerebral, traumatismo crânio-encefálico, câncer cerebral, esquizofrenia, epilepsia entre outras (vide revisão de Danbolt, 2001).

O cérebro contém grandes quantidades de glutamato mas somente uma pequena fração está presente no meio extracelular. As maiores concentrações de glutamato são encontradas nos terminais nervosos axonais (Ottersen et al., 1996). Conseqüentemente, o gradiente de concentração desse aminoácido através da membrana plasmática é de algumas milhares de vezes.

A ação excitatória de glutamato se dá através de sua ligação a receptores específicos. Uma família de receptores glutamatérgicos pode ser ativada pelo análogo de glutamato, o *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e esses receptores (NR1, NR2A, B, C e D) são coletivamente denominados de receptores NMDA. Outra família de receptores é ativada por α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole ácido propiônico (AMPA) e por kainato. De acordo com sua preferência por AMPA ou kainato, esses receptores são subdivididos em receptores AMPA (GluR1-4) e receptores kainato (GluR5-9, KA1 e KA2). Os receptores NMDA e AMPA/kainato são receptores glutamatérgicos ionotrópicos sendo este, de baixa afinidade e

dessensibilização rápida, enquanto aquele possui alta afinidade e lenta dessensibilização (von Gersdorff et al., 1998). Para ativação, NMDA necessitam de ligação direta por parte do glutamato e uma prévia despolarização da membrana. Existe ainda uma terceira família de receptores glutamatérgicos, os metabotrópicos associados à proteína G, que podem ser subdivididos nos grupos I (mGluR1 e 5), II (mGluR2 e 3) e III (mGluR4, 6, 7 e 8).

A sinalização de glutamato deve ser precisamente modulada devido à dessensibilização rápida dos receptores e de seu efeito tóxico em altas concentrações. Logo, esse transmissor deve ser removido de todo espaço extracelular uma vez que seus receptores estão presentes na maioria dos elementos celulares (dendritos, terminais nervosos, corpos neuronais bem como nas células da glia). Como não existe uma enzima que metabolize o glutamato extracelular em um nível satisfatório, a remoção deste do fluido extracelular nos arredores dos receptores se dá por reinternalização do glutamato. Esse transporte ocorre em menor escala por difusão mas ocorre, principalmente, através de proteínas transportadoras as quais usam o gradiente proto-eletroquímico através da membrana plasmática para direcionar a captação desse neurotransmissor. Existem vários carreadores na membrana plasmática como o transportador glutamatérgico de alta afinidade (também conhecido como EAATs e dependente de sódio e potássio), o transportador de baixa afinidade (sódio-independente e sensível à inibição pelo D-glutamato) e o carreador de alta afinidade independente da internalização de sódio e trocador de glutamato-cistina (Danbolt, 2001). Como esperado, quando se

inibe os transportadores glutamatérgicos da membrana aumenta-se o índice de glutamato no espaço extracelular em segundos (Jaubaudon et al., 1999).

O glutamato recaptado pelas células pode ser usado para propósitos metabólicos (síntese protéica, metabolismo energético, fixação de amônia) ou reutilizados como neurotransmissores (Danbolt, 2001).

Em terminais nervosos, a recaptação de glutamato é diretamente direcionada para a transmissão via transporte vesicular e subsequente exocitose. Como vimos anteriormente, o transporte vesicular desse aminoácido depende da geração de um $\Delta\mu\text{H}^+$ e de um carreador específico. Este possui três isoformas, já explicitadas acima, e poucas semelhanças com o transportador da membrana plasmática já que a captação glutamatérgica em VS é independente de sódio e potássio, é de baixa afinidade (K_m por volta de 1 mM), altamente seletiva para L-glutamato e estimulada por cloreto em baixas concentrações (Naito & Ueda, 1985). No citoplasma neuronal, os carreadores utilizam, preferencialmente, o $\Delta\Psi$ do $\Delta\mu\text{H}^+$ para direcionar a internalização desse transmissor (Fykse & Fonnum, 1996) mas é aceito que ΔpH é essencial para antagonizar o efluxo de glutamato e retê-lo nas VS (Wolosker et al., 1996). Deve-se considerar que a simples expressão do transportador de glutamato pode especificar o tipo de neurotransmissor usado pelo neurônio. Isso pode ser evidenciado pelo trabalho de Takamori e colaboradores (2000), que transfectaram VGLUT1 em neurônios GABAérgicos e suas sinapses tornaram-se glutamatérgicas ao passo que os neurônios que não foram transfectados continuaram apresentando fenótipo GABAérgico.

Já em astrócitos, glutamato captado do fluido extracelular deve ser convertido em glutamina por duas vias metabólicas e várias enzimas

relacionadas ao processo. A glutamina é então, liberada para o meio extracelular, recaptada por neurônios e reconvertida em glutamato no interior neuronal. Esse tráfego glutamato-glutamina entre astrócitos e neurônios foi proposto como a principal via de reciclagem glutamatérgica (Danbolt, 2001).

A seguir, faremos uma rápida descrição da anatomia e fisiologia da retina bem como de alguns de seus componentes celulares a fim de situarmos as células bipolares em seu contexto funcional no sistema visual.

I.VI. A Retina

I.VIa. Histologia e Fisiologia Básica da Retina

A primeira etapa na visão é a captura da luz pelos fotorreceptores e sua transdução em sinal elétrico. Este complexo mecanismo deve ser executado por um órgão extremamente especializado: o olho e seus componentes estruturais.

O olho é uma esfera preenchida por fluidos composta por três camadas de tecidos sendo a mais interna representada pela retina. Esta estrutura é um tecido altamente especializado de cerca de 200 µm de espessura que possui seis classes celulares principais (Wässle, 2004). A figura 2 representa, histologicamente e esquematicamente, as sete camadas da retina bem como alguns de seus tipos celulares.

Para alcançar a retina, a luz viaja sucessivamente através da córnea, do humor aquoso (líquido claro presente na câmara anterior do globo ocular e responsável por regular a pressão interna intraocular), das lentes e finalmente do humor vítreo (substância gelatinosa que mantém o formato e tamanho do globo).

Na retina, a luz é transduzida em sinal elétrico por fotorreceptores (cones e bastonetes), produzindo, assim, uma alteração no potencial de membrana de seus terminais sinápticos. Como resultado disso, temos uma variação nos índices de liberação de seu neurotransmissor- o glutamato.

Existem vários tipos de neurônios na retina organizados em cinco camadas distintas. Os fotorreceptores estão presentes na camada nuclear externa (CNE); as células horizontais, bipolares e amácrinas encontram-se na camada nuclear interna (CNI); e as células ganglionares situam-se na camada ganglionar (CG). A camada plexiforme externa (CPE) contém processos e contatos celulares de fotorreceptores, células bipolares e horizontais enquanto a camada plexiforme interna (CPI) contém sinapses de células bipolares, amácrinas e ganglionares (Kawai e Sterling, 1999).

A via direta (sinalização dos fotorreceptores para as células bipolares e destas para as células ganglionares) representa a principal via de informação disparada pela luz até ser encaminhada, através do nervo óptico, para diferentes regiões subcorticais (Masland, 2001). Deve-se ressaltar que além dessa via, há conexões e interações celulares laterais realizadas pelas células horizontais e amácrinas.

Os fotorreceptores da retina são os bastonetes e cones. Os primeiros possuem o pigmento visual rodopsina, sensível à luz azul-verde (Nathans,

1999). Bastonetes são fotorreceptores altamente sensíveis e ativos em situações de baixos níveis de luminosidade, onde conseguem capturar os poucos fótons disponíveis (visão escotópica). A visão colorida não é possível em tão baixos níveis porque sinais provenientes de um único detector (bastonetes) não podem diferenciar-se em modulações espectrais. Em ambientes com maior quantidade de luz, os pigmentos visuais dos cones respondem aos fótons seletivamente em diferentes regiões do espectro visível (visão fotópica), formando a base de nossa percepção a cores (Masland, 2001).

Nos discos dos fotorreceptores, a luz atinge moléculas sensitivas e dispara uma cascata molecular com o objetivo de controlar a concentração de GMPc celular e modular a liberação de glutamato por parte dos fotorreceptores (Kawai & Sterling, 1999). No escuro, altas concentrações de GMPc mantém canais de sódio (Na^+) abertos, levando à despolarização dos fotorreceptores. A luz diminui a concentração celular de GMPc, fechando os canais de Na^+ e hiperpolarizando a membrana plasmática do fotorreceptor (Pan & Hu, 2000).

Quando a luz hiperpolariza fotorreceptores, esse sinal desencadeia a hiperpolarização e conseqüentemente a despolarização de células bipolares e ganglionares. As células bipolares ON e OFF respondem diferentemente aos sinais dos fotorreceptores devido à expressão de diferentes receptores (metabotrópicos e ionotrópicos, respectivamente) para glutamato (Wässle, 2004). Aquelas células fazem contato com dendritos de células ganglionares e amácrinas na camada plexiforme interna. As células ganglionares (presentes na camada ganglionar), por sua vez, emitem seus axônios através da camada

de fibras nervosas, os quais originam o nervo óptico que transmitirá a informação para o córtex cerebral visual.

Adiante, abordaremos com mais detalhes as características de células bipolares da retina a fim de ressaltar suas características necessárias para o tipo de estudo que pretendíamos elaborar.

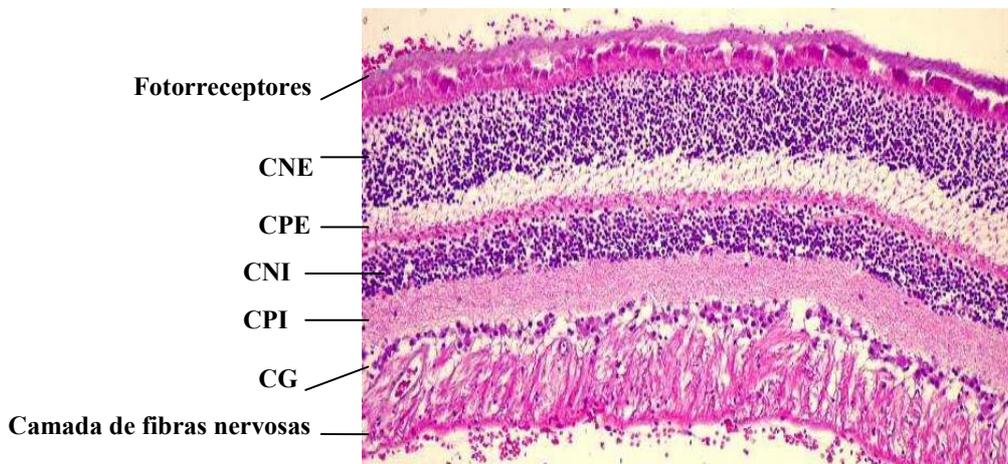
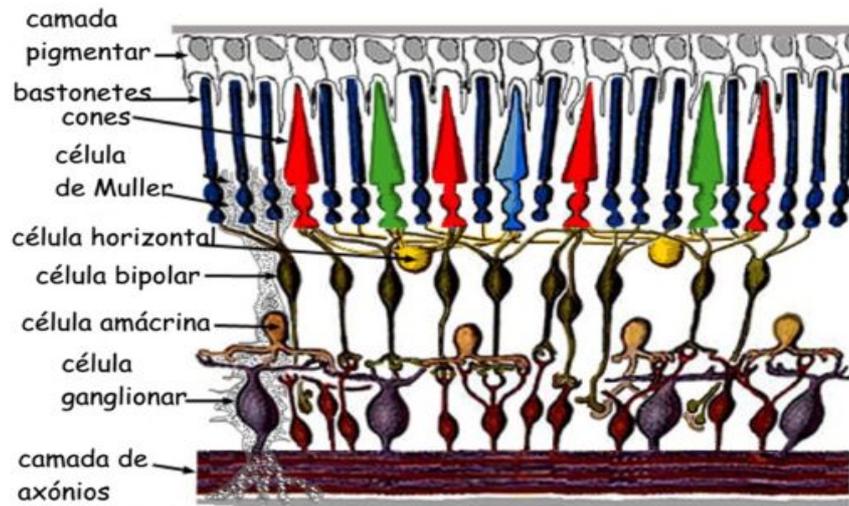


Figura 2: Representação Esquemática e Histológica da Retina. A retina é uma estrutura envolvida na transdução de sinais e composta de várias células especializadas (acima). Corte histológico de retina de humano: as camadas mais escuras contém os corpos celulares enquanto as camadas mais claras contém axônios e dendritos celulares (abaixo). Fonte: <http://curlygirl.naturlink.pt/retina.jpg>; <http://anatpat.unicamp.br/DSCN2484+++ .jpg>

I.Vb. As células Bipolares da Retina

A retina do peixe-dourado (*Carassius auratus*) possui uma classe de células bipolares que são despolarizadas pela luz (tipo ON) e contém organelas denominadas fitas sinápticas ou “ribbons” além de um atípico e grande terminal sináptico. Essas células são interneurônios que conectam fotorreceptores (cones e bastonetes) às células ganglionares e células amácrinas na retina (Marshak & Dowling, 1987) e foram primeiramente descritas por Witkovsky & Dowling (1969). Neurônios bipolares podem ser classificados morfológicamente como Mb (bipolares misturadas) já que recebem sinalização de cones e bastonetes, apesar da sinalização dos bastonetes aparentar ser predominante. Além disso, as células bipolares podem ser classificadas de acordo com o comprimento de seu axônio: as células Ma possuem um curto axônio enquanto que as Mb1 possuem um longo axônio (cerca de 50 μ m de comprimento) e são bastante abundantes na retina de peixes-dourado. O grande terminal sináptico do neurônio bipolar é capaz de liberar continuamente glutamato (Tachibana & Okada, 1991), processo desencadeado pela abertura de canais de cálcio do tipo “L” (Tachibana et al., 1993). Durante despolarização prolongada, a liberação desse neurotransmissor possui dois componentes cinéticos: um rápido componente fásico liberado em cerca de 1 ms bem como um componente lento de transmissão liberado de uma maneira contínua por centenas de ms e que atinge um platô estável (von Gersdorff et al., 1998).

I.VIc. Fitas sinápticas

Os neurônios bipolares da retina, assim como fotorreceptores e as células ciliadas do ouvido interno, possuem uma grande sinapse especializada do tipo fita sináptica. Esta é uma organela pequena e trilaminar, composta de material osmiofílico elétron-denso e orientação perpendicular à membrana plasmática (Lenzi et al., 1999). Como podemos observar na figura 3, finos filamentos de cerca de 5 nm de espessura conectam VS às fitas sinápticas, formando halos de vesículas ao seu redor (von Gersdorff et al., 1996). Estudos utilizando técnicas de capacitância de membrana revelaram que o número de vesículas que compõem o aglomerado de liberação rápido dessa célula está de acordo com o número de vesículas ancoradas na base das fitas e o pool de liberação lento iguala perfeitamente ao número de VS que se conectam às fitas nas fileiras mais distantes da membrana plasmática (von Gersdorff et al., 1996). Embora não tenhamos completo entendimento de sua função, tal arquitetura sugere que a fita sináptica funcione como uma plataforma onde VS são amadurecidas e atingem um estado de competência à fusão para permitir exocitose rápida e sustentada durante intensa estimulação (Lenzi et al., 1999; Lenzi e von Gersdorff, 2001). Existem outros possíveis cenários para a exocitose a partir das fitas sinápticas. Já que VS conectadas nas regiões mais superiores das fitas estão à cerca de 0,15 μ m afastadas das zonas ativas, especulou-se que as fitas serviriam para arremessar rapidamente VS ao longo de seu comprimento em direção à zona ativa. Outra possibilidade seria a

desconexão das VS (num processo dependente de Ca^{2+}), e sua difusão para a membrana plasmática. Seria possível também que algum tipo de exocitose composta operasse em sinapses do tipo fita sináptica, possibilitando fusões múltiplas das VS da porção inferior das fitas entre si, liberando neurotransmissores em poucos milisegundos (Parsons & Sterling, 2003). De fato, Matthews & Sterling (2008), através de técnicas eletrofisiológicas e de microscopia eletrônica de transmissão, demonstraram a presença de largas cisternas, inclusive conectadas às fitas sinápticas, após repetido estímulo da exocitose, as quais representariam vesículas fundidas entre si após estímulo tônico.

Quatro proteínas estão associadas aos ribbons, das quais 3 são presumidas como proteínas estruturais. RIBEYE é a única proteína conhecida que localiza-se exclusivamente no ribbon sináptico (Heidelberger et al., 2005). Existem aproximadamente 4000 moléculas de RIBEYE numa única célula bipolar do tipo Mb1 (Zenisek et al., 2004) e, acredita-se que essa proteína seja o alicerce principal do ribbon (Heidelberger et al., 2005). As proteínas Bassoon e Piccolo são proteínas da citomatriz presentes em sinapses do tipo ribbon mas deve-se salientar que, inexplicavelmente, células bipolares não possuem imunomarcagem para Bassoon (Dick et al., 2001). Por último, KIF3A é membro de uma superfamília de cinesinas e componente da proteína motora cinesina II (Hirokawa & Takemura, 2004). Uma possível função de KIF3A é o transporte de estruturas do corpo neuronal para as zonas ativas.

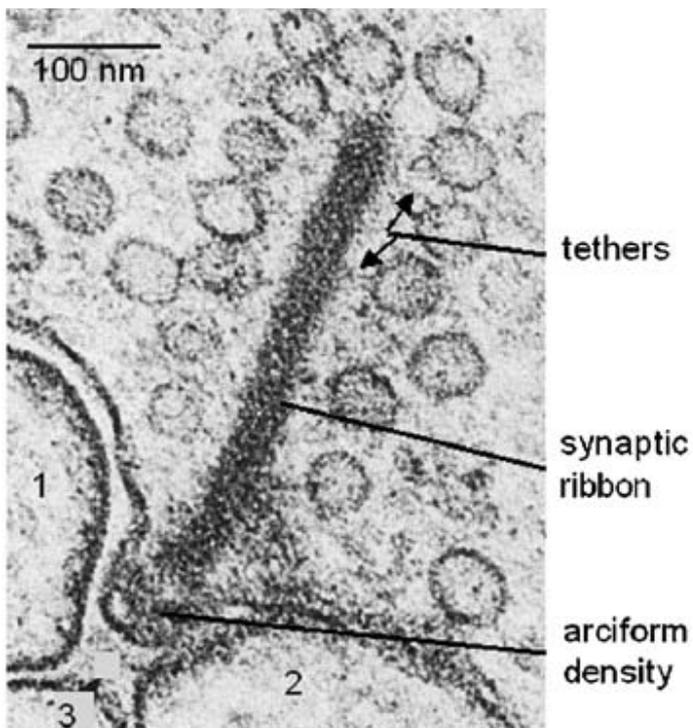


Figura 3: Fita Sináptica de um Fotorreceptor da Retina Visualizado Através de Micrografia Eletrônica. O ribbon é uma estrutura elétron-densa presente nas zonas ativas de fotorreceptores e células bipolar. Esta estrutura é cercada por VS que se conectam à ele através de filamentos. O ribbon de uma célula bipolar não apresenta densidade arciforme. Retirado de Heidelberg et al., 2005.

I.V. Proteínas Cinase e Fosfatase X Neurotransmissão

A fosforilação de proteínas funciona como um essencial modulador da transmissão e plasticidade sinápticas operando através de um balanceamento da ação de proteínas cinases e fosfatases. Esse processo leva à ativação de vários alvos celulares tais como receptores de membrana e participa em processos tais como tráfego de proteínas, interações proteína-proteína bem como mecanismos distintos da sinaptogênese (Turner et al., 1999; Fischer et al., 2003; Munton et al., 2004).

Cinases e fosfatases são bons candidatos como possíveis reguladores de diversos eventos do ciclo da VS (Li & Murthy, 2001). As cinases são efetoras da fosforilação enquanto que as fosfatases efetuam a desfosforilação. Estas são abundantes no cérebro, onde juntamente com proteínas cinases, contribuem para a plasticidade sináptica e memória. Por exemplo, cinases como PKA, PKC e CaMKII apresentam envolvimento na plasticidade sináptica por modularem, através de fosforilação, receptores glutamatérgicos (Soderling & Derkach, 2000). As fosfatases do tipo 1 (PP1) e do tipo 2 (PP2A e PP2B ou calcineurina) são particularmente abundantes no sistema nervoso central, onde desenvolvem distintas funções (Ingebritsen & Cohen, 1983, Colbran, 2004). Fosfatases do tipo PP1 modulam a transmissão glutamatérgica via regulação do receptor pós-sináptico AMPA (Yan et al., 1999); só para citar alguns exemplos.

Embora seja inegável a importância dos ciclos de fosforilação-desfosforilação para diversas funções sinápticas, não sabemos perfeitamente como se processa esse evento em vários alvos celulares. O mecanismo de fosforilação da sinapsina, uma fosfoproteína presente nos terminais sinápticos, é melhor compreendido que qualquer outro no tráfego sináptico devido sua relevância para a plasticidade da sinapse. Esta proteína ancora grande parte das vesículas ao citoesqueleto, constituindo assim o aglomerado de reserva de vesículas citoplasmático. Com o potencial de ação e conseqüente aumento dos níveis de íons Ca^{2+} , CaMKII fosforila a região C-terminal da sinapsina, reduzindo sua afinidade com as vesículas e com o citoesqueleto de actina, e resultando assim na mobilização e liberação de vesículas da reserva citoplasmática (Greengard et al., 1993; Turner et al., 1999).

Possivelmente, cinases e fosfatases participam de outros processos celulares fundamentais os quais ainda não foram bem caracterizados. Procurando elucidar se ciclos de fosforilação-desfosforilação atuavam controlando a acidificação de grânulos secretórios de células parafoliculares (PF); Tamir e colaboradores (1994) reportaram, através de inibidores de proteínas cinases e fosfatases, que a acidificação desses grânulos ocorre realmente por fosforilação e desfosforilação de alvos protéicos. Foi evidenciada crucial importância de proteínas cinases como PKA e PKC para a fosforilação de CLC e conseqüente abertura destes. Mulberg e colaboradores (1991) também ressaltaram a importância da atividade de PKA na acidificação celular através de efeitos na condutância de CLC e, recentemente, foi demonstrada a participação de CaMKII na regulação do movimento de cloreto

em células T84 (Huang et al., 2001). Assim, o pH de grânulos secretórios de células PF e de VS poderia ser modulado através de alteração da condutância de correntes de cloro e não por uma ação direta na H^+ V-ATPase (Barasch et al., 1988) através de eventos de fosforilação e desfosforilação de proteínas, os quais funcionariam como uma regulação central na transmissão sináptica.

Esses estudos então nos levam a concluir os CLCs podem participar de alguma maneira do processo de acidificação de grânulos secretórios, sendo modulados por diferentes proteínas cinases. Não se sabe, no entanto, se fosforilação e desfosforilação poderiam controlar a acidificação vesicular em terminais nervosos. Considerando que a atividade neuronal pode efetivamente modificar ciclos de fosforilação e desfosforilação em terminações nervosas, é importante avaliar o potencial da modulação desse processo na acidificação de VS. Assim, averiguar se os mecanismos anteriormente descritos ocorrem em VS de neurônios e se a acidificação de vesículas é modulada por proteínas cinases e outros mensageiros celulares é de grande interesse para a área da neurociência.

II. Justificativa e Relevância

Sendo o pH ácido vesicular essencial para o armazenamento e captação de neurotransmissores, alterações na geração do pH resultariam numa redução na concentração de neurotransmissores nas vesículas, levando a exocitose de vesículas vazias e até paralisia da transmissão.

Reconhecer qual(is) é(são) o(s) modulador(es) do processo de acidificação de vesículas contribui para um maior entendimento do processo de transmissão e poderia estabelecer alvos interessantes para a ação de drogas e fármacos num futuro próximo. Poderíamos, então, modular indiretamente a quantidade de neurotransmissores nas VS. Isto é ainda mais interessante num modelo glutamatérgico que, como já foi dito anteriormente, apresenta grande interesse fisiopatológico por estar relacionado a diversas patologias e doenças clínicas.

Assim determinado, procuramos responder as seguintes perguntas: I) Como as VS são acidificadas? II) Qual(is) seria(m) os moduladores desse processo? III) Será que um déficit na acidificação das vesículas implicaria numa exocitose, endocitose e reciclagem anormais?

Visando responder essas perguntas, utilizamos os neurônios bipolares da retina de peixe dourado, células que apresentam um grande terminal sináptico, com cerca de 10 μm de diâmetro, sendo de formato ideal para medidas de capacitância e eletrofisiologia. Esse terminal sináptico possui um reservatório citoplasmático contendo, aproximadamente, 1.000.000 de VS (von Gersdorff et al.,1996; Lenzi & von Gersdorff, 2001), tornando-o adequado para o tipo de estudo que pretendíamos desenvolver.

Como já fôra demonstrado que CLC de grânulos secretórios são modulados por proteínas cinases (Tamir et al.,1994), investigaremos se ativadores e inibidores de cinases conseguem alterar a acidificação de VS em sinapses do tipo ribbon da retina de peixe, um processo que pode alterar o conteúdo quântico das vesículas. Revelado tal processo, teremos um maior conhecimento de um passo crucial da comunicação neuronal.

Observaremos também se vesículas com conteúdo quântico reduzido ou até mesmo abolido podem sofrer ciclos de exocitose e endocitose em células bipolares de retina. Já que esta célula libera neurotransmissores de forma tônica e sustentada, observaremos se existe um “mecanismo de controle” celular que assegure que VS “vazias” não sejam preferencialmente liberadas em detrimento de vesículas preenchidas com glutamato. Este processo possibilitaria maior fidedignidade da comunicação e impediria falha ou interrupção na transmissão sináptica.

III. Objetivos

III.I. Objetivo Geral

Investigar o processo de acidificação de VS em células bipolares da retina *extra vivo* e como esse processo é modulado por ciclos de fosforilação e desfosforilação.

III.II. Objetivos Específicos

- Padronizar técnica de marcação de neurônios bipolares da retina de peixe com as sondas fluorescentes LysoTracker e LysoSensor para evidenciar acidificação de VS.
- Observar o efeito de fármacos que alteram componentes do gradiente proto-eletroquímico (Metilamina, NH₄Cl e Bafilomicina) na acidez intravesicular visualizada pelas sondas fluorescentes LysoTracker e LysoSensor.
- Investigar se inibidores de proteínas fosfatases interferem com a acidificação de VS em neurônios bipolares da retina.
- Investigar se PKA, PKC e CaMKII interferem com a acidificação de VS em neurônios bipolares de retina por meio de ativadores e inibidores específicos.

- Padronizar a marcação de VS de neurônios bipolares da retina com a sonda fluorescente FM1-43.
- Investigar se alterações na acidificação de vesículas alteram o tráfego vesicular através da sonda fluorescente FM1-43.

IV. Metodologia

IV.I. Drogas e Químicos

LysoSensor Green DND 189 (100 nM), LysoTracker DND 89 (100 nM) e FM1-43 (4 uM) foram adquiridos da Molecular Probes (Eugene, OR); Metilamina (10 mM), Staurosporina (100 nM), Bafilomicina (500 nM), Ciclosporina A (1-10 uM) e Caliculina A (10-100 nM) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. SP-cAMP (100 nM), RP-cAMP (100 nM), KN93 (1 uM), PMA (100 nM e 1 uM), 4alpha-PMA (100 nM) e Calphostin C (100 nM) foram obtidos da Calbiochem (Alemanha). De acordo com recomendações dos fabricantes, todas as drogas e químicos foram dissolvidos em DMSO, aliqüotadas em concentrações cerca de mil (1000) vezes maior que as que seriam utilizadas em nossos experimentos e mantidas congeladas. Todos os outros químicos e reagentes são da grade analítica.

IV.II. Obtenção de Células Bipolares

Os neurônios bipolares da retina eram obtidos de acordo com metodologia descrita por von Gersdorff & Matthews (1994) e Guatimosim et al., (2002). Seguimos as recomendações do comitê de ética em experimentação animal (CETEA/UFMG) para a realização dos experimentos com animais. Esforços foram realizados para se minimizar o número de cobaias utilizadas em nossos experimentos. De uma maneira resumida, os peixes-dourado da espécie

Carassius auratus eram decapitados, tinham seus olhos removidos e abertos para posterior isolamento da retina. As retinas eram submetidas à digestão enzimática: primeiramente com hialuronidase (1100 unidades/ml) por 20 min e a seguir era mantida em papaína/cisteína (30 unidades/ml) por 60 min. Após lavagem com meio fisiológico (Fish Ringer: NaCl 120 mM; KCl 2.6 mM; MgCl₂ 1.0 mM; CaCl₂ 2.5 mM; HEPES 10 mM, glicose 1.8 g/L pH 7.3), pequenos fragmentos da retina eram gentilmente dissociados através de pipetas *pasteur* de vidro polidas no fogo e plaqueados em lamínulas para posterior marcação com as sondas fluorescentes LysoTracker e LysoSensor e visualização no microscópio confocal.

IV.III. Imageamento da Fluorescência da Acidificação de Vesículas Sinápticas

LysoTracker (LT) e LysoSensor (LS) são sondas fluorescentes acidotrópicas que se acumulam dentro de vesículas secretórias acídicas (Cousin e Nicholls, 1997; Giner et al., 2007). Essas sondas possuem importantes características, incluindo alta seletividade para organelas acídicas e marcação efetiva de células vivas em concentrações nanomolares.

LT é um fluoróforo ligado à uma base fraca que se acumula seletivamente em compartimentos celulares de baixo pH. Embora não se saiba exatamente, em ambientes acídicos, esse corante se torna parcialmente protonado e fluorescente, sendo utilizado como sonda para acompanhar o

tráfego de organelas acídicas intracelulares. Assim, o LT possui alta seletividade para a marcação de organelas acídicas em concentrações nanomolares. Nesta tese, células bipolares da retina eram marcadas com LT (100 nM) por 10 min e acopladas a um sistema de perfusão. Quando células previamente marcadas com LT eram perfundidas com Fish Ringer sem a sonda associada, uma diminuição brusca da fluorescência era observada em poucos minutos (dados não mostrados), indicando que a marcação é prontamente reversível sob lavagem. Desse modo, em experimentos com ativadores e/ou inibidores de proteínas cinases e fosfatases, terminais de células bipolares eram previamente marcados com LT por 10 min e logo após expostos às drogas por mais 10 min na presença contínua da sonda. É importante mencionar que após 10 min de marcação, os níveis máximos de fluorescência eram alcançados e incubação adicional de LT não alterava os níveis de fluorescência (Figura 5C), sugerindo que máxima marcação para LT era obtida dentro de 10 min de exposição à sonda.

LS também se acumula especificamente em organelas acídicas mas exibe um aumento da fluorescência sob acidificação de um modo mais sensível ao pH, ao contrário de LT, como resultado de protonação. O protocolo usado em nossos experimentos foi similar ao descrito por Cousin & Nicholls (1997). Células bipolares eram expostas ao LS (100 nM) por 20 min (tempo no qual conseguíamos índices máximos de fluorescência para LS, veja figura 9), eram então brevemente lavadas e montadas num sistema de perfusão. Em experimentos controles, as células eram incubadas por 15 min com Bafilomicina, Metilamina e NH_4Cl antes e durante os 20 min de marcação

com LS e comparados aos controles. Realizávamos os mesmos procedimentos em experimentos com ativadores e inibidores de proteínas cinases e fosfatases: células bipolares também eram incubadas por 15min com esses fármacos. As imagens eram coletadas por uma objetiva de imersão à óleo Zeiss (63X, 1.2 NA) acoplada ao microscópio confocal de escaneamento à laser Zeiss LSM 510 (CEMEL-UFMG) ou ao sistema confocal Biorad MRC1024 (Departamento de Farmacologia, ICB-UFMG). As células eram excitadas com o laser He/Ne a 568 nm e a luz emitida era coletada por um filtro para 598/40 nm para a sonda LT e imagens eram capturadas a 450 nm de excitação e 510 nm de emissão para LS no microscópio Zeiss. Os mesmos parâmetros eram selecionados para o microscópio Biorad, excetuando-se que a amostra era excitada com o laser Argônio a 488 nm e a luz emitida era coletada por filtro ajustado para óptica FITC. É importante ressaltar que todas as imagens obtidas no mesmo dia para as condições controle e teste eram adquiridas utilizando os mesmos parâmetros como força do laser, ganho, níveis de cinza, abertura da íris. Isto nos permitiu comparar qualitativamente e quantitativamente as imagens controle e teste do mesmo dia.

IV.IV. Monitoramento e Imageamento com FM1-43

Em estudos do ciclo sináptico, é possível visualizar os passos de exocitose e endocitose em tempo real utilizando marcadores fluorescentes vitais captados durante a endocitose e liberados durante a exocitose (Lichtman et al., 1985; Betz et al., 1992; Ribchester, et al., 1994).

Entre as sondas fluorescentes disponíveis para monitoramento do ciclo de VS, tornou-se muito difundido o uso de marcadores do tipo “FM”. Marcadores, como o FM1-43, são moléculas anfipáticas nas quais uma cauda lipofílica está ligada a uma cabeça carregada positivamente via ligações duplas. A cabeça carregada positivamente impede o marcador de atravessar livremente as membranas celulares, mantendo-o preso no interior de endossomas ou vesículas (Figura 4). Por sua vez, o comprimento da cauda lipofílica determina a afinidade da molécula por membranas.

Finalmente, o número de duplas ligações unindo a cabeça à cauda determina as propriedades espectrais da sonda. Por exemplo, o FM1-43 tem uma dupla ligação e pode ser excitado no espectro da fluoresceína enquanto o FM4-64 apresenta 3 ligações duplas entre cabeça e cauda, sendo excitado no espectro da rodamina (Betz, et al., 1996; Brumback et al., 2004).

A família de marcadores do tipo FM apresenta três propriedades que a tornam muito útil para estudo do tráfego de vesículas: (1) marcadores do tipo FM se ligam reversivelmente à membrana celular. Portanto, quando a sonda é aplicada à preparação, toda superfície de membrana exposta ao meio contendo

FM torna-se marcada e fluorescente. Então, num neurônio bipolar, por exemplo, todo o contorno dessa célula encontra-se marcado enquanto seu interior não apresenta fluorescência. Quando a preparação é lavada em meio desprovido de FM, as moléculas do marcador são removidas da superfície celular. (2) Moléculas de FM marcam seletivamente o folheto externo da bicamada lipídica. Isto possibilita que as vesículas em reciclagem nos sítios de endocitose capturem o marcador e o mantenham aprisionado em seu interior. Além disso, as moléculas de FM estão permanentemente carregadas (cabeça com valência ⁺²), impedindo que elas se difundam livremente através das membranas e se tornem livres no citoplasma. (3) Sondas do tipo FM são menos fluorescentes quando estão em ambiente aquoso mas sua fluorescência aumenta aproximadamente 350 vezes quando estão agregadas ao ambiente hidrofóbico das membranas (Betz et al., 1996; Brumback et al., 2004).

Portanto, em meio contendo FM1-43, após exocitose e incorporação da membrana das vesículas à membrana da zona ativa durante a despolarização, a endocitose compensatória promoverá reciclagem dos aglomerados vesiculares de reciclagem com membrana marcada com FM de modo que as vesículas recicladas apresentarão o marcador aprisionado em seu interior e aderido à sua membrana. Este processo sugere que houve um tráfego normal das VS (exocitose e endocitose de vesículas). Assim, numa célula bipolar, temos que a marcação de seu terminal evidencia que houve a exocitose e, após um breve período, a endocitose compensatória de VS (e consequente marcação de FM1-43 no terminal sináptico).

O imageamento da fluorescência de FM1-43 foi idêntico ao descrito para as sondas LysoTracker e LysoSensor excetuando-se que utilizamos o laser 488 de argônio para se excitar a preparação e filtro para a ótica FITC. Células bipolares foram marcadas com FM1-43 (4 uM) em Fish Ringer modificado contendo 0 mM Ca^{2+} e 50 mM KCl (Lagnado et al., 1996; Guatimosim et al., 2002). Após 120 s, as células eram perfundidas com Fish Ringer modificado contendo 2.5 mM Ca^{2+} , 4 uM FM1-43 e 50 mM KCl por 120 s ou 360 s e a imagem coletada. Grupos de células em tratamento com Bafilomicina, Metilamina e NH_4Cl eram incubados com estas drogas por 10 min antes e durante exposição ao Fish Ringer modificado com Ca^{2+} .

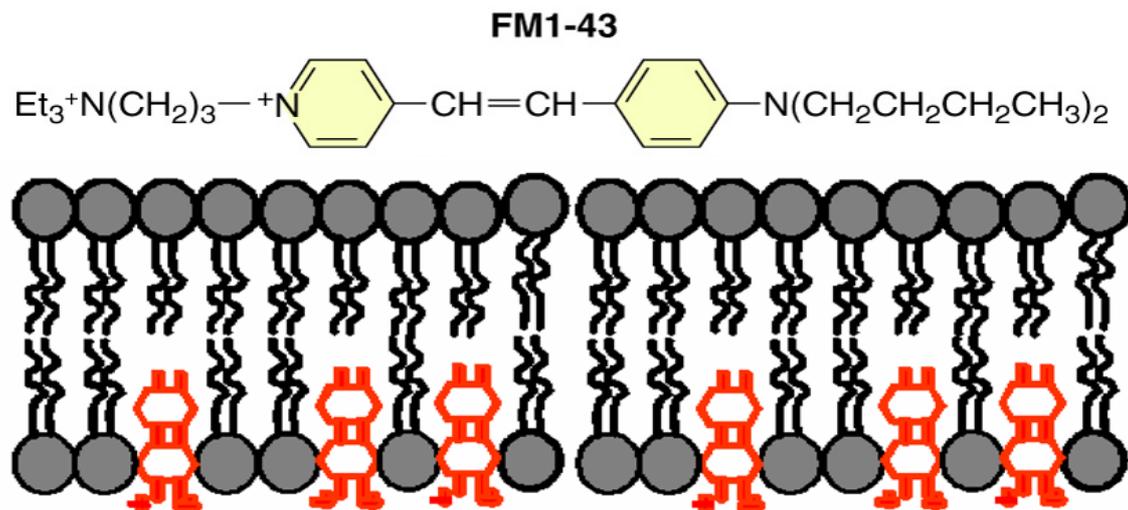


Figura 4: O Marcador Fluorescente FM1-43 é Utilizado para o Monitoramento dos Ciclos de Endocitose e Exocitose de Vesículas Sinápticas em Células Neurais. Estrutura da sonda fluorescente FM1-43. Notar a presença de duplas ligações e a carga elétrica positiva na parte polar da sonda, à esquerda. Abaixo, a sonda FM1-43 (estrutura em vermelho) insere-se na bicamada lipídica da membrana plasmática (em cinza) mas sem atravessá-la completamente. Quando inseridas em meio hidrofóbico, a fluorescência aumenta centenas de vezes.

IV.V. Análise de Imagens

Mensurações da fluorescência eram realizadas usando o software Metamorph Imaging System 4.0 (Universal Imaging Corporation). Resumidamente, secções no plano Z de células bipolares eram obtidas e as secções contendo a imagem em foco do terminal eram selecionadas. Medimos a fluorescência nos terminais nervosos enquadrando a área desejada e salvando as regiões de interesse (ROI). Estas eram usadas como controle e referência aos tratamentos subsequentes. Não foram observadas maiores alterações no diâmetro dos terminais nervosos ao compararmos as imagens ROI antes e após exposição às sondas e/ou drogas. As mensurações da intensidade de fluorescência eram expressas em níveis de cinza (8 bit). Valores numéricos eram plotados em gráficos utilizando-se o programa Sigma Plot 9.0.

Análise da intensidade de fluorescência de FM1-43 em grupos controle e grupos com tratamento com Bafilomicina, Metilamina e NH₄Cl (Figuras 12 e 13) foram realizados utilizando-se o programa Image Tools (University of Texas at San Antonio, TX, USA). Análises dos perfis de fluorescência foram feitos a fim de se comparar a distribuição de fluorescência espacial nos terminais de células controle e de células em tratamento. A intensidade dos pixels foi mensurada através de ROI nos terminais sinápticos. Histogramas de intensidade de fluorescência *versus* grupos experimentais foram feitos através do programa Sigma Plot 9.0.

IV.VI. Análise Estatística

Os dados eram expressos como valores médios com o erro padrão de um número (n) de células. Diferenças estatísticas usando o teste *t*-student pareado. Valores $P < 0,05$ eram considerados estatisticamente significativos.

V. Resultados

V.I. Marcação de Neurônios Bipolares da Retina com LysoTracker

Dentre os tipos celulares na retina, neurônios bipolares eram identificados e selecionados devido à sua típica morfologia, como podemos observar na figura 5A, à esquerda. Essas células apresentam uma díade de processos dendríticos, corpo celular em formato ômega originando um delgado axônio o qual se dirige para um grande terminal sináptico de forma ovóide (von Gersdorff et al., 1996). Além disso, as células escolhidas para o prosseguimento dos experimentos deveriam estar saudáveis, o que poderia ser conferido pela ausência de granulações no núcleo e terminal sináptico bem como a ausência de dilatação dos dendritos ou outro tipo de deformação celular.

As células bipolares marcadas com LT (100 nM) por 10 min exibiam uma pronunciada fluorescência no terminal sináptico (Fig 5A, direita). LT possui a propriedade de corar organelas acídicas e sabendo-se que os terminais de células bipolares são densamente preenchidos com VS (von Gersdorff et al., 1996) e que essas vesículas liberam prótons via exocitose (Palmer et al., 2003), assumimos que essas organelas correspondem à maior fonte da fluorescência de LT. De fato, Stenovec & colegas (2007) demonstraram que a marcação de LT colocaliza-se com a fluorescência de VGLUT em astrócitos,

indicando que a maior fração do sinal fluorescente de LT está localizada em VS. Portanto, nas imagens bi-dimensionais mostradas no presente trabalho, assumimos que o sinal fluorescente ao longo da membrana dos terminais celulares corresponde às vesículas situadas próximas à membrana plasmática.

A marcação no corpo celular era bem mais fraca se comparada ao terminal (Fig 5B) e pode refletir uma maior acidez do meio intracelular se comparado ao extracelular bem como a presença de lisossomas e outras organelas acídicas. Os níveis de fluorescência após 10 min em LT não foram estatisticamente diferentes dos níveis obtidos durante 40 min de experimentos com a sonda (Fig 5C). Este dado é muito importante já que nos possibilita realizar experimentos ao longo de 40 min sem que alterações na fluorescência de LT possam mascarar os resultados obtidos (i.e., proporcionando falsos resultados). Interessante notar que se uma célula já previamente marcada com LT fosse perfundida com meio fisiológico (Fish Ringer) na ausência da sonda, uma perda de fluorescência ocorre de maneira progressiva (vide metodologia) durante o tempo verificado. Com base nesses resultados, estabelecemos que as drogas e agentes farmacológicos que seriam utilizados nos próximos experimentos deveriam ser associados ao LT, na mesma concentração, a fim de se evitar uma perda na fluorescência pelo efeito da lavagem. Esse procedimento, por si só, não aumenta a fluorescência primariamente obtida por um efeito cumulativo de sonda (dados não mostrados).

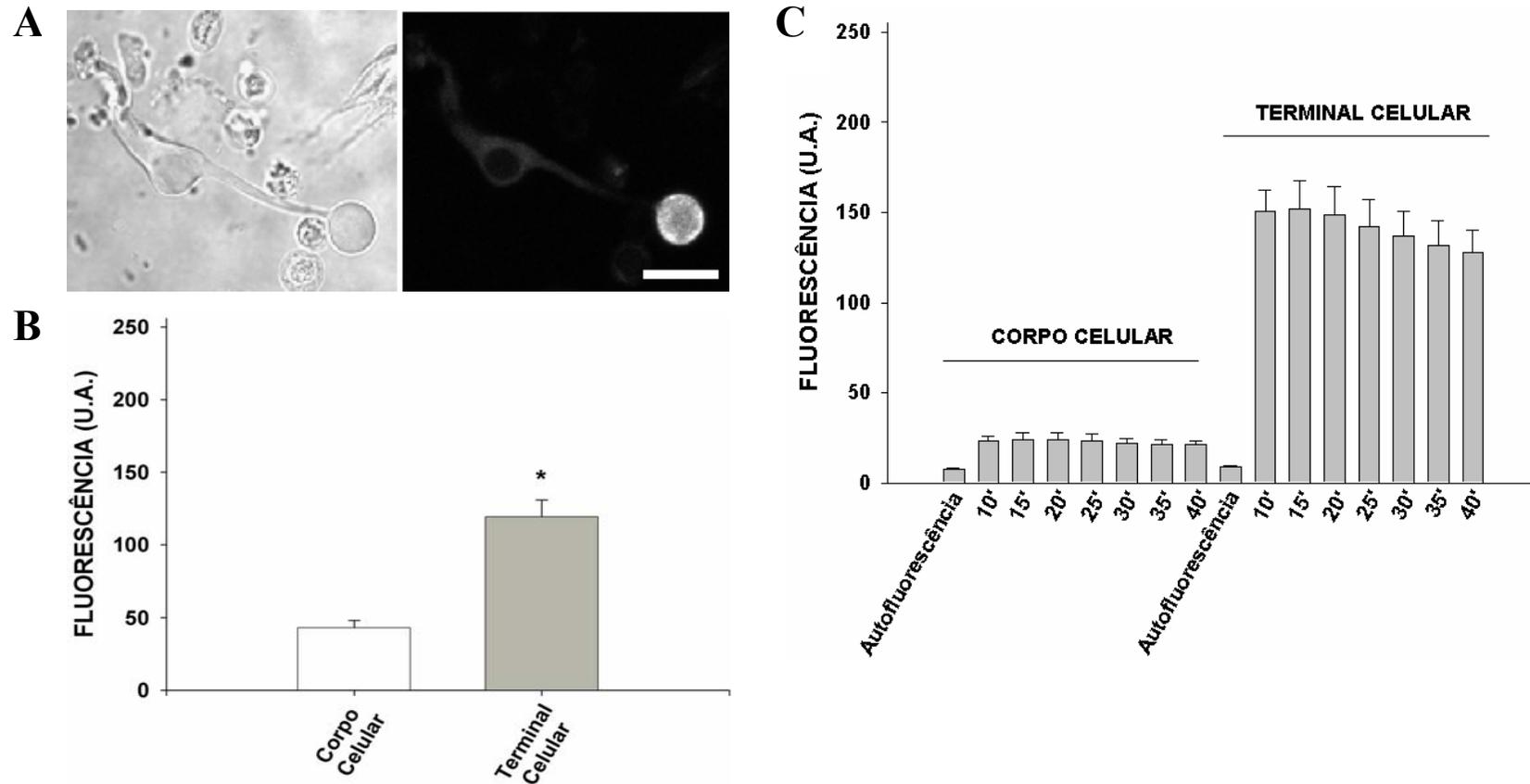


Figura 5: LysoTracker Marca Preferencialmente Terminais Bipolares da Retina. A) Imagem em luz transmitida de uma célula bipolar representativa da retina do tipo Mb1 (esquerda). A mesma célula foi marcada com LT (100 nM) por 10 min (direita). B) Gráfico demonstra o aumento dos níveis de LT nos terminais em comparação aos corpos celulares (* $P < 0,05$) após 10 min de exposição ao LT. $n = 7$ células. Barra de escala = 10 μ M. C) Gráfico mostra que a marcação de LT permanece sem maiores alterações por até 40 min de experimentos. $n = 13$ células.

Se considerarmos que LT marca VS em células bipolares da retina, bases fracas permeáveis à membrana como NH_4Cl e Metilamina deveriam diminuir a intensidade de fluorescência da sonda por dissiparem o ΔpH vesicular (Cousin & Nicholls, 1997; Camacho et al., 2006). Assim como NH_4Cl , Metilamina é também capaz de colapsar ΔpH mas sem alteração ou proporcionando mínimo aumento de $\Delta\Psi$ (Cousin & Nicholls, 1997). Para confirmar que em nosso modelo experimental LT marca VS, realizamos experimentos utilizando NH_4Cl e Metilamina. A figura 6A apresenta células bipolares representativas da retina (imagens em Dic nos painéis à esquerda) marcadas com LT (100 nM) por 10 min (painéis do meio) e a seguir expostas ao NH_4Cl (30 mM) e Metilamina (10 mM) por 10 min (painéis inferior e médio, à direita, respectivamente). Como podemos observar, as células testadas demonstraram uma pronunciada diminuição dos níveis de fluorescência de LT após exposição aos agentes farmacológicos testados. Essas bases poderiam diminuir a fluorescência de VS mas também a de outras organelas presentes no terminal sináptico bipolar, como mitocôndrias (von Gersdorff et al., 1996). Com o intuito de especificar se a diminuição da fluorescência corresponde realmente ao colapso do ΔpH vesicular, utilizamos a Bafilomicina (500 nM)- um bloqueador da H^+ -V-ATPase que colapsa todo o $\Delta\mu\text{H}^+$ (Moriyama & Futai, 1990). Este fármaco também causou uma pronunciada redução da fluorescência de LT em terminais bipolares após 10 min de pré-incubação (vide figura 6A, painel superior à direita). A figura 6B mostra um gráfico quantitativo no qual se realizou uma análise quantitativa

da redução da fluorescência de vários terminais celulares após o tratamento com NH_4Cl (quadrado), Metilamina (triângulo) e Bafilomicina (círculo). Interessante notar que NH_4Cl produziu uma diminuição abrupta dos níveis de fluorescência dos terminais axonais logo nos primeiros 5 min (* $P < 0,05$) ao passo que não houve alterações significativas no tempo de 10 min ($P > 0,05$) em relação ao tempo de 5 min. Não obstante, Metilamina e Bafilomicina produziram reduções significativas na fluorescência tanto no tempo de 5 min de exposição (* $P < 0,05$) quanto no de 10 min (** $P < 0,05$). Os corpos celulares também apresentaram redução da fluorescência durante exposição à NH_4Cl , Metilamina e Bafilomicina, porém em muito menor grau se comparado ao terminal celular e como pretendíamos selecionar a variação da fluorescência (i.e., da acidificação das VS), passamos a excluir os dados relacionados aos corpos celulares. Em conjunto, os dados obtidos sugerem que o sinal fluorescente de LT é originado, preponderantemente, de VS em terminais bipolares.

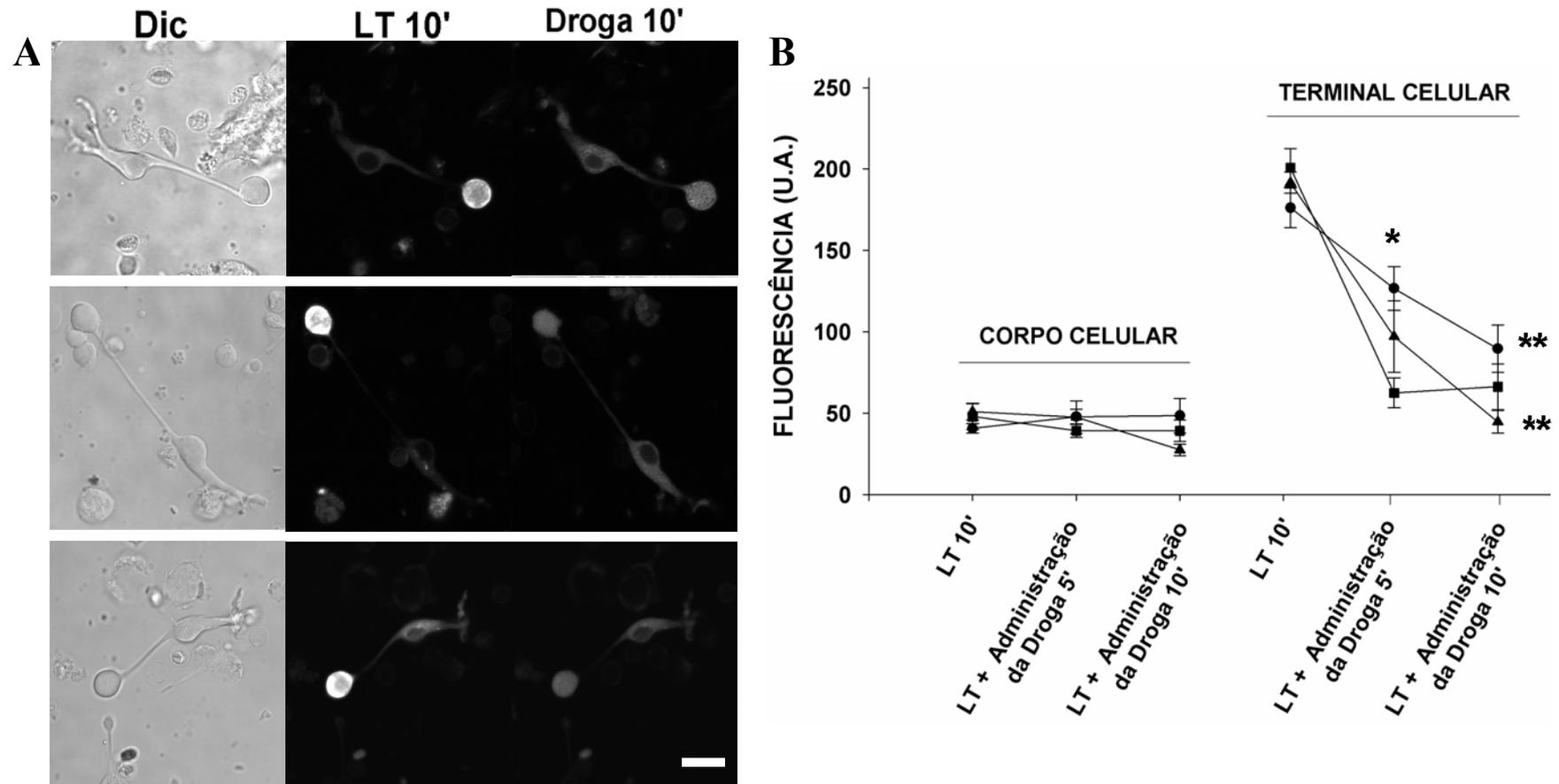


Figura 6: LysoTracker Marca Predominantemente Vesículas Sinápticas em Neurônios Bipolares da Retina. A) Imagens representativas de células bipolares em Luz transmitida (Dic) (painel à esquerda), marcadas com LT por 10 min (painel do meio) e expostas à Bafilomicina em 500 nM (painel superior, à direita), Metilamina em 10 mM (painel do meio, à direita), e NH₄Cl em 30 mM (painel inferior, à direita) associados ao LT (100 nM) B) Gráfico revela que houve brusca queda dos níveis de fluorescência (*P<0,05) em decorrência de 10 min de exposição às drogas para todos grupos testados: Bafilomicina (círculo, n= 9); Metilamina (triângulo, n= 11) e NH₄Cl (quadrado, n= 9). Barra de escala = 10 µm.

V.II. Inibição de Proteínas Fosfatases Aumenta a Marcação de LysoTracker em Células Bipolares

Ciclos de fosforilação e desfosforilação dependem da participação de proteínas cinases e fosfatases para a manutenção do perfeito equilíbrio fisiológico. Proteínas serina/treonina fosfatases são classificadas como fosfatases do tipo 1 (PP1), tipo 2 (PP2, subtipos A, B ou calcineurina e C) e tipo 3 (PP3-7) (Herzig & Neumann, 2000). Análise de distribuição tecidual revela que PP1 e PP2 são particularmente abundantes em neurônios e várias proteínas que participam do ciclo exo-endocítico são reguladas por fosforilação e desfosforilação (Turner et al., 1999). Tamir e colegas (1994) reportaram previamente que inibidores de proteínas cinases e fosfatases antagonizaram a acidificação e secreção vesicular induzidas por secretagogos e a secreção em células parafoliculares. Esses autores concluíram que ciclos de fosforilação e desfosforilação protéica deveriam estar envolvidas na ativação de CLCs e dessa forma, modulavam o processo de acidificação e secreção de grânulos secretórios em células parafoliculares da tireóide.

A fim de averiguarmos se proteínas fosfatases participam na acidificação de VS em células bipolares, testamos se inibidores de fosfatases poderiam alterar a fluorescência de LT. A premissa para os referidos experimentos é bastante simples: se inibirmos a desfosforilação protéica através de inibidores específicos de fosfatases, é possível perpetuar a

fosforilação por um maior tempo, o que produziria, por conseguinte, maior acidificação vesicular. A figura 7A (painel superior) mostra células bipolares marcadas com LT por 10 min na presença do inibidor específico de PP2B (proteína fosfatase dependente de Ca^{2+} /calmodulina), Ciclosporina A (CA) em várias concentrações: 10 nM, 500 nM, 1 uM e 10 uM. As figuras 7A (painel superior) e 7B indicam que CA proporcionou um grande aumento nos níveis de fluorescência de LT nos terminais bipolares em concentrações na faixa de 1 e 10 uM (* $P < 0,05$) enquanto que concentrações de 10 e 500 nM de CA não produziram quaisquer efeitos significativos ($P > 0,05$). Esses achados podem ser visualizados no histograma comparativo da figura 7B, que mostra a quantificação da fluorescência de várias células que foram marcadas com LT na ausência ou na presença de CA.

Nós também investigamos se Caliculina A (Calic), um inibidor de PP2A com potência similar ao ácido okadáico e também inibidor de PP1, mas com potência cerca de 10-100 vezes maior, poderia alterar a marcação de LT nos terminais de células bipolares. Assim como CA, Calic (nas concentrações de 10 e 100 nM) produziu aumentos significativos (* $P < 0,05$) na fluorescência de LT em células bipolares (veja fig 7A, painel inferior). No entanto, Calic em baixas concentrações (0,1 nM) não foi capaz de produzir alterações significativas ($P > 0,05$) na intensidade de fluorescência em relação aos terminais controles (Fig 7A). A figura 7C, que mostra a quantificação da fluorescência de várias células que foram marcadas com LT na ausência ou na presença de Calic (0,1; 10; 100 nM).

Os resultados obtidos até o momento sugerem então que a inibição de proteínas fosfatases altera a marcação de LT em terminais de neurônios bipolares. Como fosforilação e desfosforilação são processos interligados que podem atuar nos mesmos alvos (Imhof et al., 1980) e, sabendo que proteínas cinases já foram relacionadas ao processo de acidificação de grânulos e VS (Tamir et al., 1994; Mulberg et al., 1991), procuramos observar qual(is) proteína(s) cinase(s) poderia(m) estar envolvida(s) no ciclo de fosforilação-desfosforilação para a regulação da acidificação de VS em nosso modelo neuronal.

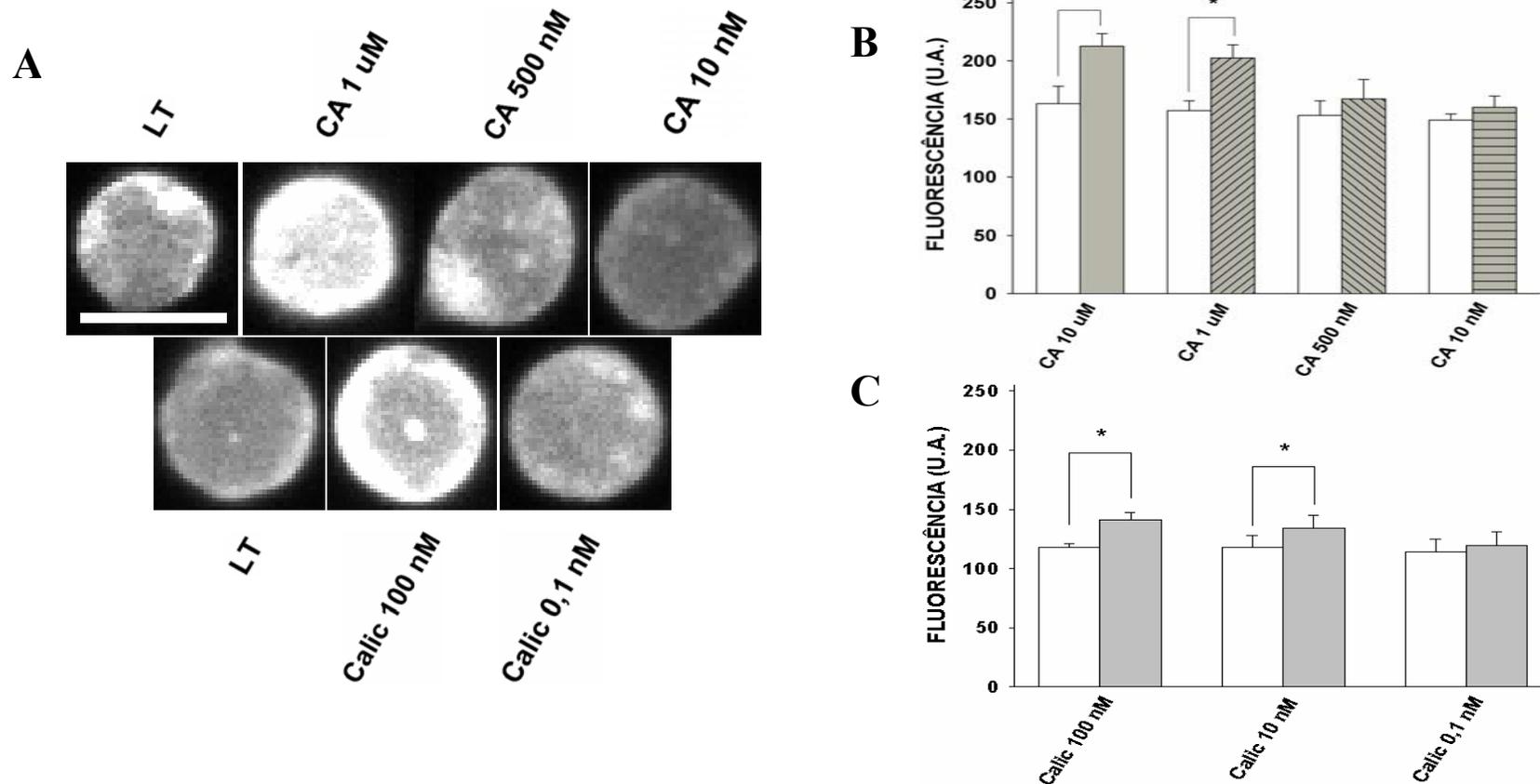


Figura 7: Inibidores de Fosfatases Alteram o Padrão de Fluorescência de LysoTracker em Terminais Bipolares da Retina. A) Painel mostra terminais celulares representativos marcados com LT 100 nM (primeiro e quinto painéis), CA 1 uM (segundo painel), CA 500 nM (terceiro painel), CA 10 nM (quarto painel), Calic 100 nM (sexto painel) e Calic 0,1 nM (sétimo painel). Barra de escala = 10 μ m. B) Histograma demonstra que CA nas concentrações de 1 uM (* $P < 0,05$; $n = 11$; controle $n = 11$) e 10 uM (* $P < 0,05$; $n = 11$; controle $n = 11$) produziu maior marcação de LT em relação aos controles (barras brancas) e concentrações não efetivas de CA à 500 nM ($P < 0,05$; $n = 6$; controle $n = 6$) e 1 nM ($P < 0,05$; $n = 5$; controle $n = 5$). C) Histograma demonstra que células expostas à Calic 10 nM (* $P < 0,05$; $n = 8$; controle $n = 8$) e 100 nM (* $P < 0,05$; $n = 7$; controle $n = 7$) apresentaram aumento na fluorescência de LT em relação aos controles (barras brancas). Não foi detectado aumento de LT no grupo de células exposto à Calic em 0,01 nM ($P > 0,05$; $n = 6$; controle $n = 6$). Barra de escala = 8 μ m. As barras correspondem à média \pm erro padrão (SEM).

V.III. PKA e CaMKII não Modificam a Marcação de LysoTracker em Neurônios Bipolares da Retina.

PKA e CaMKII são proteínas cinases ativadas por segundos mensageiros e implicadas na mediação da transmissão sináptica de curto e longo prazo (Weisskopf et al., 1994; Mayford et al., 1995). Ativação de PKA e CaMKII modula a exocitose de VS e aumenta a liberação de neurotransmissores em terminais pré-sinápticos (revisado por Leenders et al., 2005). Tamir e colegas (1994) reportaram previamente que inibidores de PKA interferem com a acidificação de grânulos e secreção de células parafoliculares. Objetivando determinar se PKA interfere com a acidificação de VS em neurônios bipolares da retina, células bipolares foram pré-incubadas por 10 min com SP-cAMP (100 nM), o qual é um potente ativador de PKA permeável à membrana ou com RP-cAMP (100 nM), um inibidor específico dessa cinase (Wang et al., 1991). Os terminais nervosos tratados com SP-cAMP exibiram marcação similar se comparados aos terminais tratados simplesmente com LT (Fig 8A, segundo painel). O gráfico 8B mostra que a fluorescência de terminais bipolares marcados com LT permaneceu estatisticamente similar ($P > 0,05$) após o tratamento com SP-cAMP se comparados ao controle. Além disso, não foram observadas quaisquer alterações significativas para o grupo de células marcado com LT e tratado com RP-cAMP (Fig 8A, terceiro painel; e Fig 8B). Não detectamos também alterações na fluorescência de células quando o inibidor seletivo de CaMKII, KN93 (1 μ M), foi adicionado às células bipolares previamente marcadas com LT (Fig 8A, quarto painel). A figura 8B

demonstra que KN93 não proporciona alteração significativa da fluorescência de LT no terminal de células bipolares.

A figura 9 demonstra que concentrações maiores de SP-cAMP (50 uM -triângulo para baixo e 100 uM -triângulo para cima) também não produziram alterações significativas na fluorescência de LT ($P > 0,05$). Os mesmos resultados foram observados com KN93 nas concentrações de 1 uM (quadrado) e 10 uM (círculo) (figura 9). Deve-se ressaltar que o análogo inativo de KN93, KN92, possui autofluorescência quando excitado com o comprimento de onda utilizado nos experimentos com LT e por esse motivo não pôde ser utilizado em nossos experimentos.

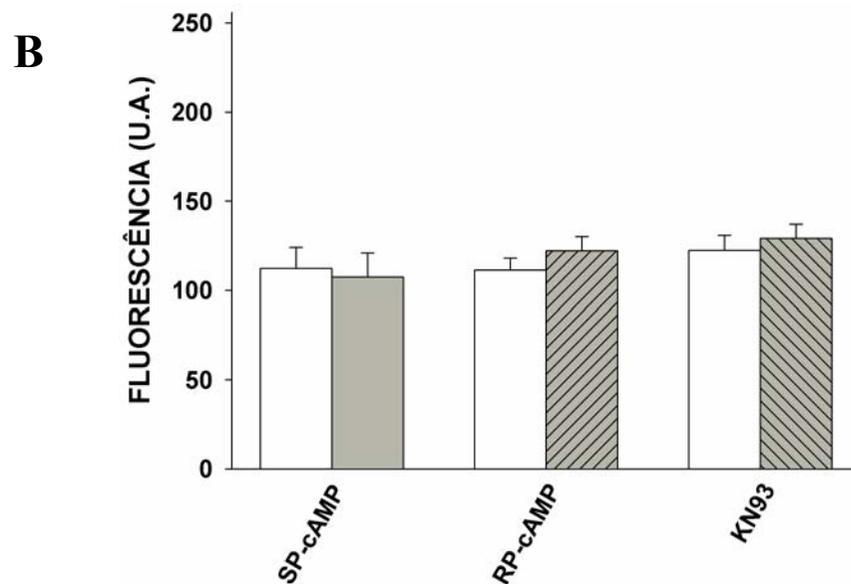
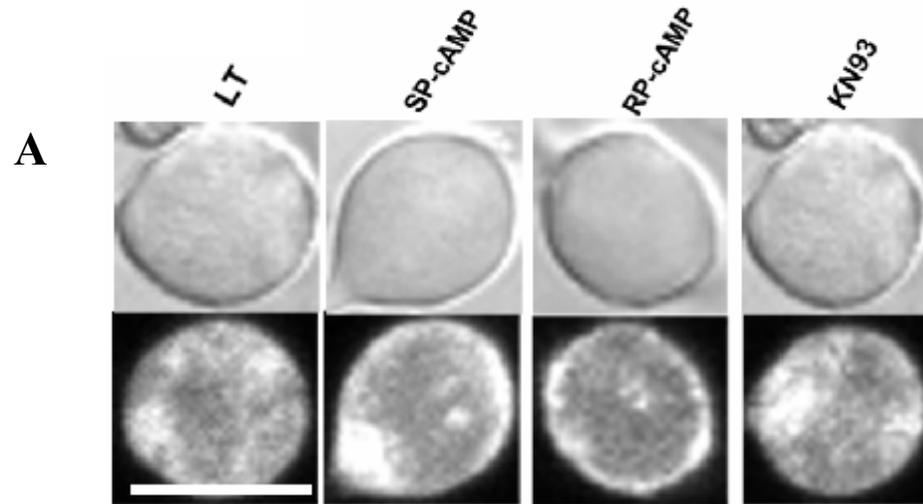


Figura 8: PKA e CaMKII não Modificam a fluorescência de LysoTracker em Terminais Bipolares de Retina. A) Painel mostra terminais celulares representativos marcados com LT 100 nM (primeiro painel), SP-cAMP 100 nM (segundo painel), RP-cAMP 100 nM (terceiro painel) e KN93 1 uM (quarto painel). Barra de escala = 10 μ m. Fileira superior do painel: imagens em luz transmitida. Fileira inferior do painel: Imagens em fluorescência. B) Histograma mostrando que grupos de células expostos ao SP-cAMP ($P > 0,05$; $n = 10$), RP-cAMP ($P > 0,05$; $n = 9$) e KN93 ($P > 0,05$; $n = 9$) não obtiveram alterações significativas na fluorescência de LT se comparados com grupos de células controle (barras brancas, n é o mesmo para cada fármaco testado) em células bipolares da retina. As barras correspondem à média \pm erro padrão (SEM).

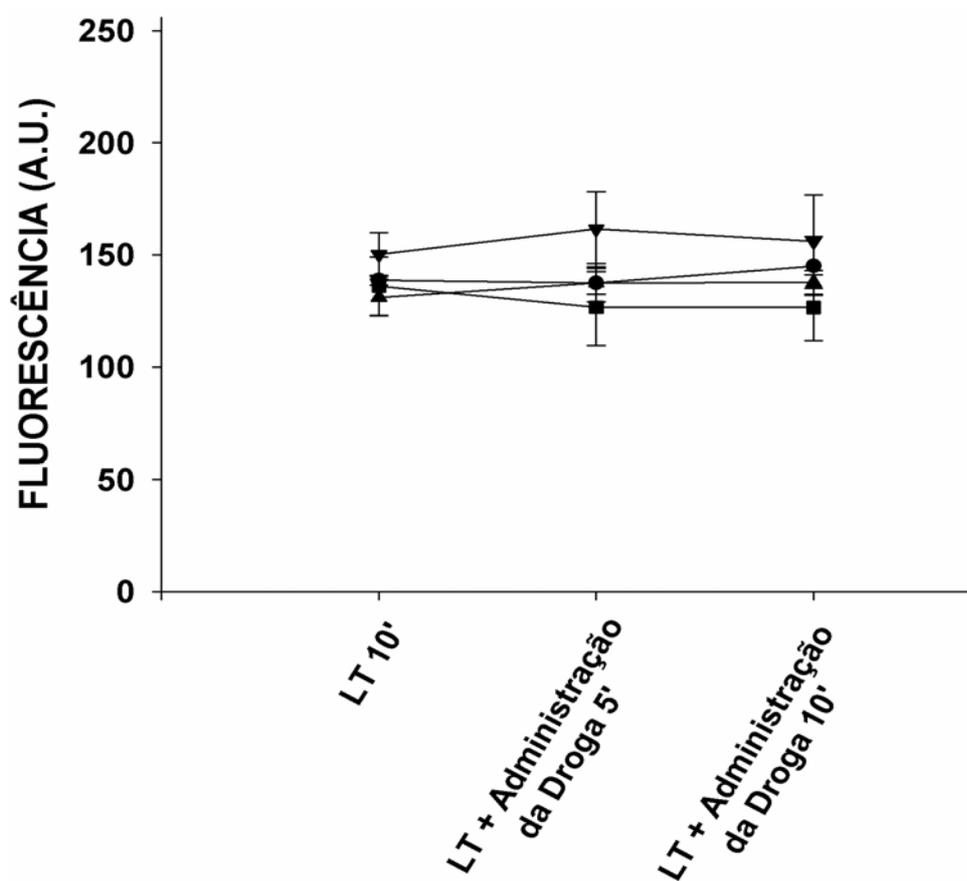


Figura 9: SP-cAMP e KN93 não Alteram o Padrão de Fluorescência de LysoTracker em Terminais Bipolares da Retina. Gráfico revela que células bipolares previamente marcadas com LT e em seguida expostas ao LT (100 nM) associado ao SPc-AMP em 50 uM (triângulo para baixo; n= 10), 100 uM (triângulo para o alto; n= 8) e ao KN93 em 1 uM (quadrado; n=8) e 10 uM (círculo; n= 9) não apresentaram alterações significativas na fluorescência de LT ($P > 0,05$).

V.IV. A Ativação de PKC Aumenta a Fluorescência de LysoTracker em Terminais de Células Bipolares.

Nosso próximo passo foi investigar se outra cinase abundantemente expressa em células bipolares e também já relacionada ao aumento da acidificação em grânulos secretórios (Tamir et al., 1994), a PKC, poderia alterar a marcação de LT no terminal desses neurônios. Para investigar se a fosforilação de PKC modula a acidificação de VS, nós testamos o efeito da ativação dessa cinase com o seu ativador específico, o éster de forbol PMA (Phorbol 12-myristate 13 acetate), na fluorescência de LT em células bipolares (Berglund et al., 2002). Um terminal nervoso representativo que foi marcado com LT por 10 min e logo a seguir exposto ao PMA (100 nM) por 10 min é mostrado na figura 10A (segundo painel). O aumento da fluorescência induzido por PMA permaneceu por pelo menos 30 min de experimentos (dados não mostrados). Os mesmos resultados foram obtidos quando PMA foi ministrado na concentração de 1 μ M, mas não em 10 nM (vide figura 11). Calphostin C (CALP) (100 nM), um inibidor altamente específico de PKC (Kobayashi et al., 1989), não causou nenhum efeito significativo na fluorescência de LT após 10 min de tratamento, indicando que esse inibidor sozinho não interfere com a marcação de LT (Fig 10A, terceiro painel). Entretanto, quando as células bipolares foram marcadas com LT na presença de CALP e então expostas ao PMA associado ao CALP, não foi detectado um aumento no sinal de fluorescência similar ao que era antes observado com PMA (Fig 10A, quarto painel). De fato, após 10 min de exposição ao PMA e CALP, neurônios

marcados com LT apresentaram os mesmos índices de fluorescência encontrados em terminais marcados sem droga alguma (Fig 10B). Estes resultados indicam que a ativação de PKC deve modular a acidificação de VS.

No entanto, considerando que sondas LT acumulam-se em compartimentos acídicos mas que o aumento de sua fluorescência não é estritamente dependente de pH, utilizamos um marcador mais sensível ao pH para confirmar esses resultados. Nós então escolhemos o LS, o qual exibe um aumento de fluorescência pH-dependente, para confirmar se a fosforilação por PKC realmente modula a acidificação de VS nessas células.

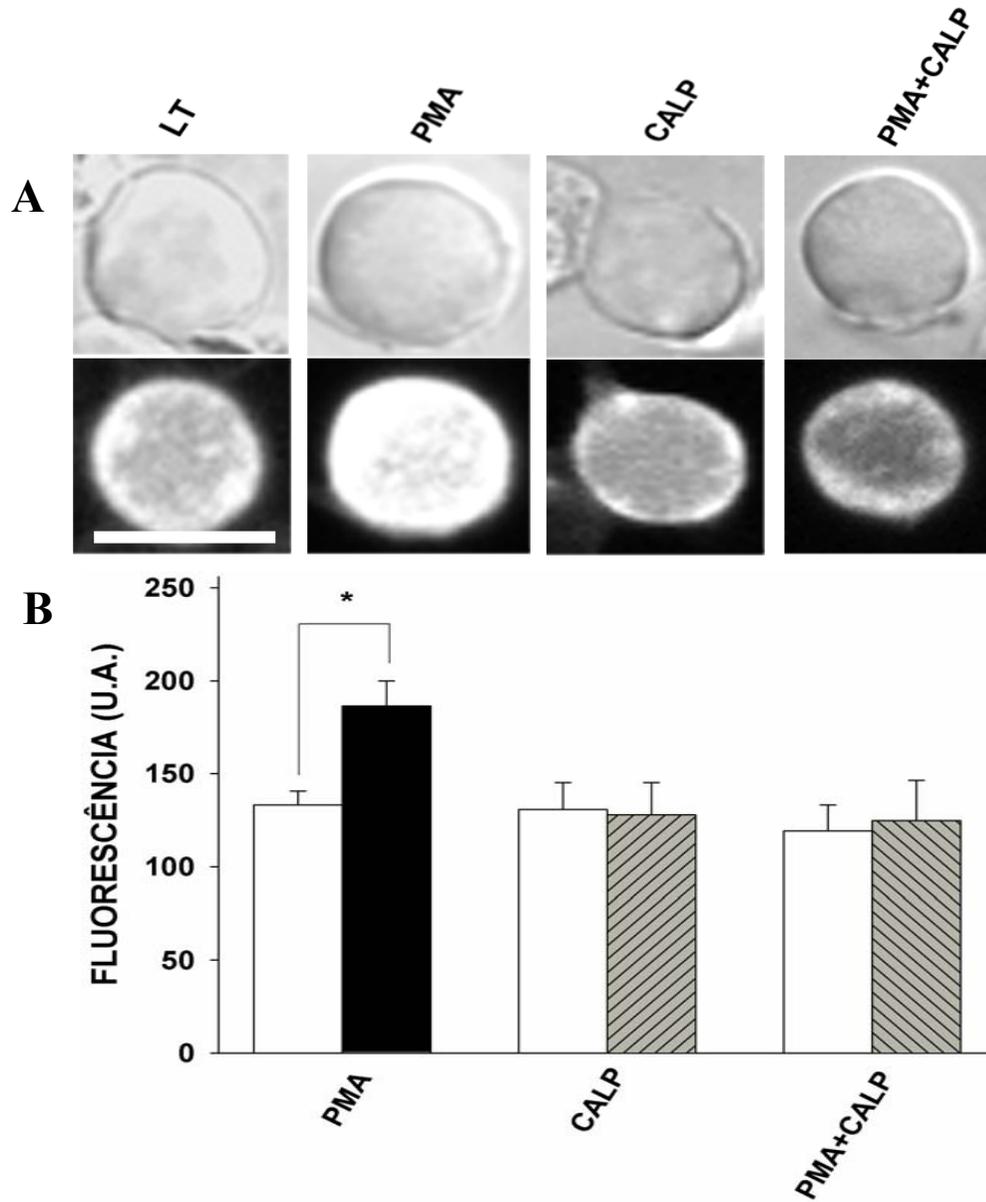


Figura 10: PKC Altera o Padrão de Fluorescência de LysoTracker em Terminais Bipolares da Retina. A) Painel apresenta terminais celulares representativos de diferentes células marcadas com LT 100 nM (primeiro painel) e expostas ao PMA 100 nM (segundo painel), CALP 100 nM (terceiro painel) e PMA+CALP (quarto painel). Barra de escala= 10 μ m. Fileira superior: imagens em luz transmitida. Fileira inferior: Imagens em fluorescência. B) Histograma mostra que PMA aumenta a fluorescência de LT se comparado aos controles (* $P < 0,05$; $n = 8$), enquanto células expostas ao CALP ($P > 0,05$; $n = 9$) e PMA+CALP ($P > 0,05$; $n = 9$) não apresentaram alterações na fluorescência se comparado aos controles (barras brancas, n é o mesmo para cada fármaco testado). As barras correspondem à média \pm erro padrão (SEM).

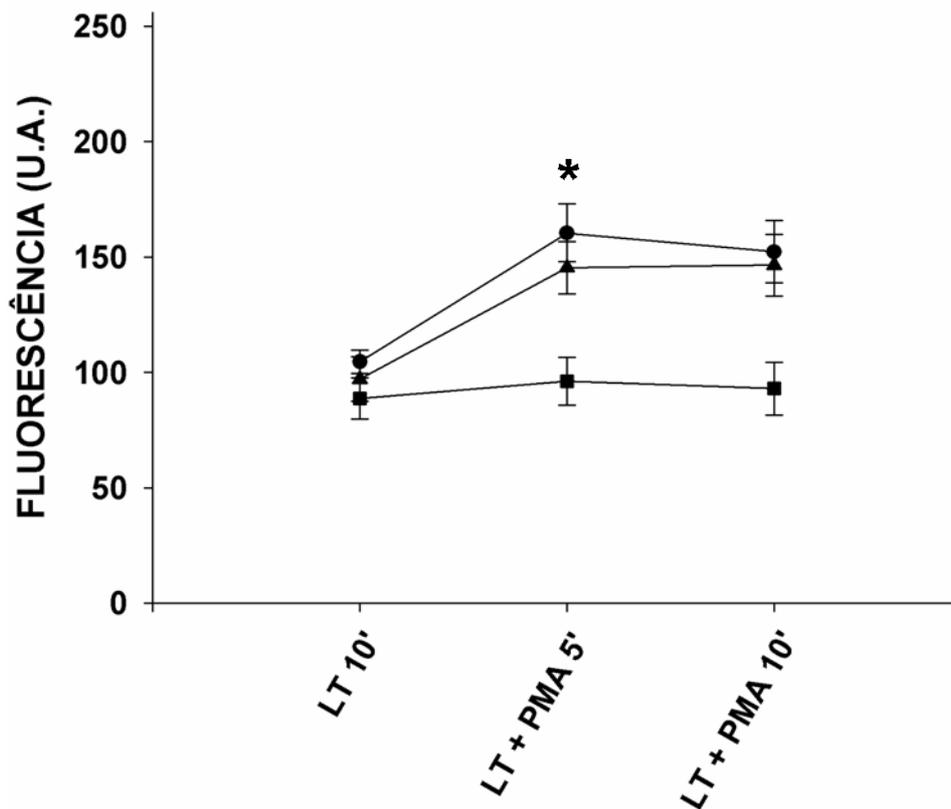


Figura 11: PMA Altera o Padrão de Fluorescência de LysoTracker em Terminais Bipolares da Retina. Gráfico mostrando que células bipolares previamente marcadas com LT e em seguida expostas ao LT (100 nM) + PMA nas concentrações de 100 nM (triângulo; n= 9) e 1 uM (círculo; n= 8) obtiveram aumentos na fluorescência produzida por LT (* $P < 0,05$) enquanto que PMA em 10 nM (quadrado; n= 6) não produziu alterações significativas na fluorescência de LT ($P > 0,05$).

V.V. A Ativação de PKC aumenta a fluorescência de LysoSensor em Neurônios Bipolares.

Inicialmente, realizamos a padronização da marcação de neurônios bipolares da retina com LS. A marcação de LS nos terminais atinge seu valor máximo em 20 min sem que maiores alterações possam ser observadas durante 40 min de experimentos (Fig 12C). Como podemos averiguar na figura 10A, temos uma célula bipolar representativa marcada com LS (100 nM) por 20 min. O padrão de fluorescência de LS é bastante similar ao de LT, com pontos fluorescentes visíveis ao longo do terminal. Este, mais uma vez, obteve maiores índices de fluorescência (*P< 0,05) em relação ao corpo celular (Fig 12B).

Realizamos uma série de experimentos controle com Metilamina (10 nM), NH₄Cl (30 mM) e Bafilomicina (500 nM) para confirmar se a fluorescência de LS altera de acordo com o $\Delta\mu\text{H}^+$ de VS. As células eram pré-incubadas com cada agente farmacológico por 10 min e depois incubadas com LS (100 nM) associado às mesmas drogas por 20 min (Fig 13A). Na presença de todos agentes farmacológicos testados, os terminais nervosos apresentaram redução estatística na fluorescência (*P< 0,05) em relação aos controles (vide Fig 13B). Estes resultados corroboram com os observados por Cousin & Nicholls (1997) em células granulares do cerebelo e sugerem que em nosso modelo LS marca VS acídicas e que a fluorescência resultante dessa marcação é dependente do pH vesicular.

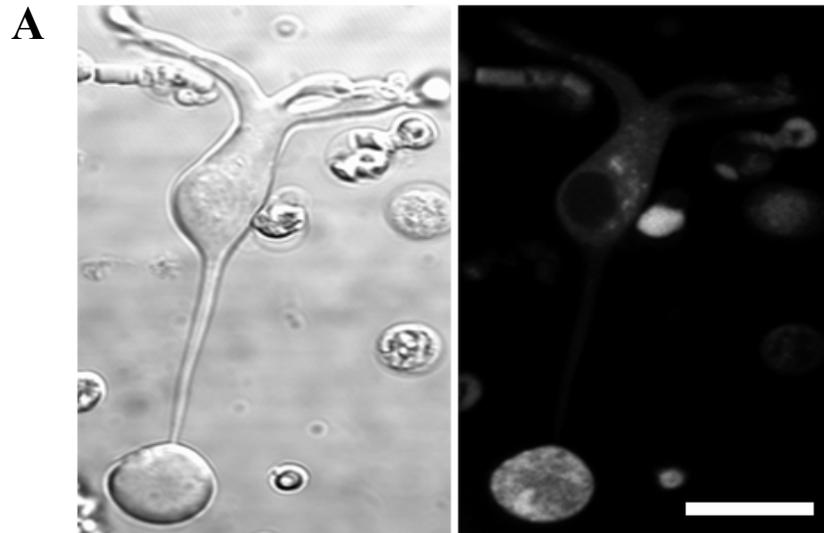
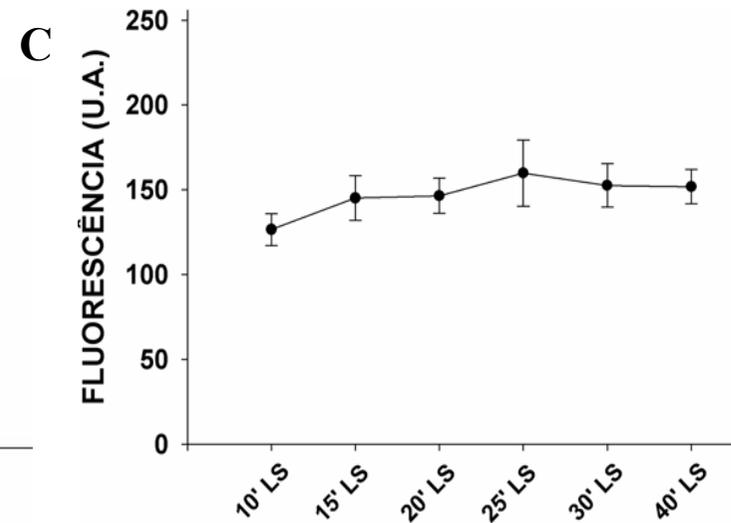
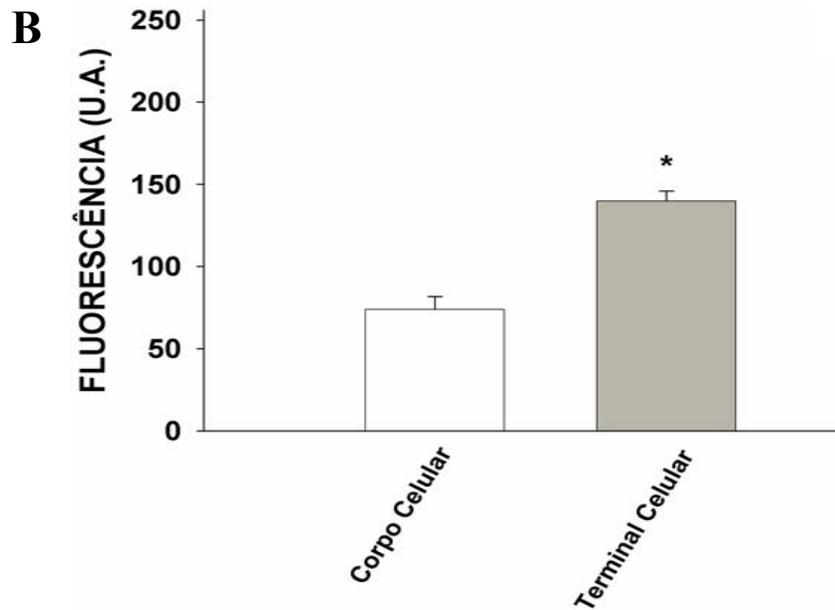


Figura 12: Marcação de LysoSensor em Neurônios Bipolares de Retina. A) Imagem em luz transmitida de uma típica célula bipolar (esquerda). Mesma célula após 20 min de marcação com LS (100 nM) (direita). B) Gráfico mostrando o aumento dos níveis de fluorescência no terminal sináptico em relação ao corpo celular em várias células (* $P < 0,05$; $n = 11$) após 20 min de exposição à sonda. C) Gráfico marcação de LS *versus* tempo de experimento. Barra de escala= 10 μm .



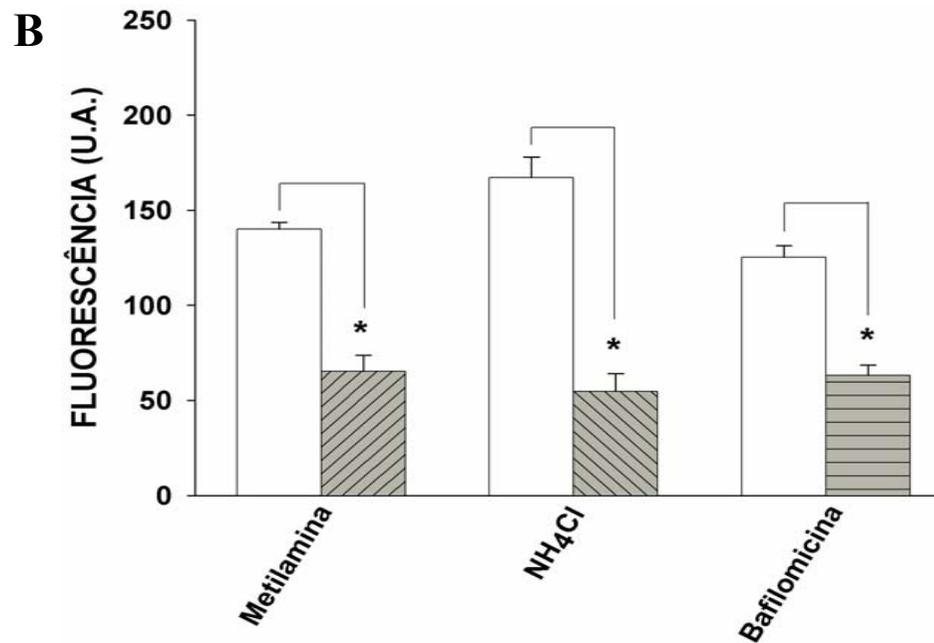
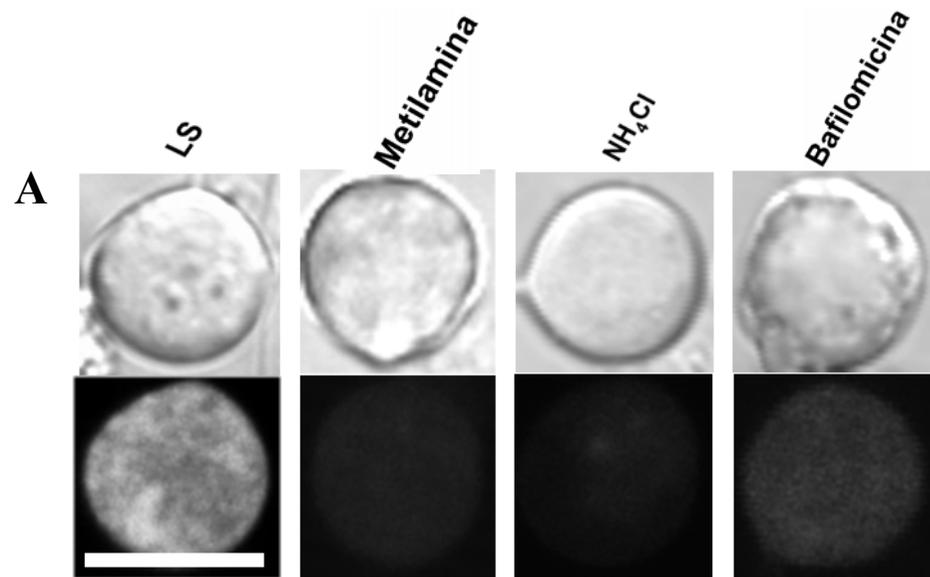


Figura 13: A Marcação de LysoSensor é Dependente do Gradiente Eletroquímico ($\Delta\mu\text{H}^+$) A) Terminais celulares representativos marcados com LS (100 nM) por 20 min (primeiro painel), pré-incubados com Metilamina 10nM (segundo painel), NH_4Cl 30 mM (terceiro painel) e Bafilomicina 500 nM (quarto painel). Barra de escala= 10 μm . Fileira superior: imagens em luz transmitida. Fileira inferior: imagens em fluorescência. B) Gráfico demonstrando que em todos os terminais celulares pré-incubados por 10 min com Metilamina (n= 8), NH_4Cl (n= 10) e Bafilomicina (n= 10) e mantidos na solução durante marcação com LS evidenciaram uma redução significativa (* $P < 0,05$) da fluorescência em relação aos controles (barras brancas, n é o mesmo para cada fármaco testado). As barras correspondem à média \pm erro padrão (SEM).

Iniciamos então, experimentos com ativadores e inibidores de PKC utilizando o LS para monitorar variações de fluorescência pH-dependentes. Como já foi previamente observado com LT, PMA (100 nM) induziu um grande aumento de fluorescência de LS após 20 min de incubação com a droga (Fig 14A, segundo painel) se comparado ao terminal nervoso controle (Fig 14A, primeiro painel). Em baixas concentrações, PMA (10 nM) não conseguiu aumentar a fluorescência de LS de uma maneira significativa (dados não mostrados). CALP (100 nM) sozinho não alterou a marcação de LS nos terminais celulares (Fig 14A, terceiro painel). Entretanto, PMA não induziu a aumentos na fluorescência de LS quando as células foram pré-incubadas com CALP por 10 min (Fig 14A, quarto painel). Nós exploramos esse efeito de PMA utilizando o inibidor de proteínas cinases de amplo espectro, Staurosporina (100 nM). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de fluorescência em terminais marcados com LS ou em terminais marcados com LS e incubados na presença de PMA e Staurosporina (STAU) (Fig 14B). 4alpha-PMA (100 nM), o análogo inativo de PMA, não produziu aumentos na fluorescência de LS se comparado às condições controle (Fig 14B). Os resultados acima mostram que a ativação de PKC aumenta a fluorescência de LS e que a fosforilação de PKC pode modular a acidificação de VS em neurônios bipolares da retina.

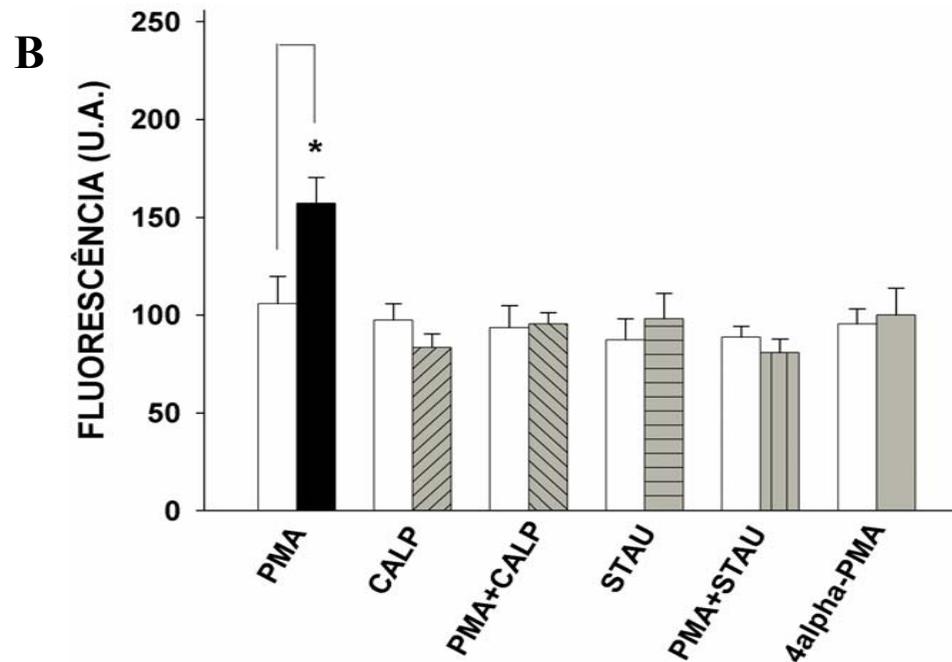
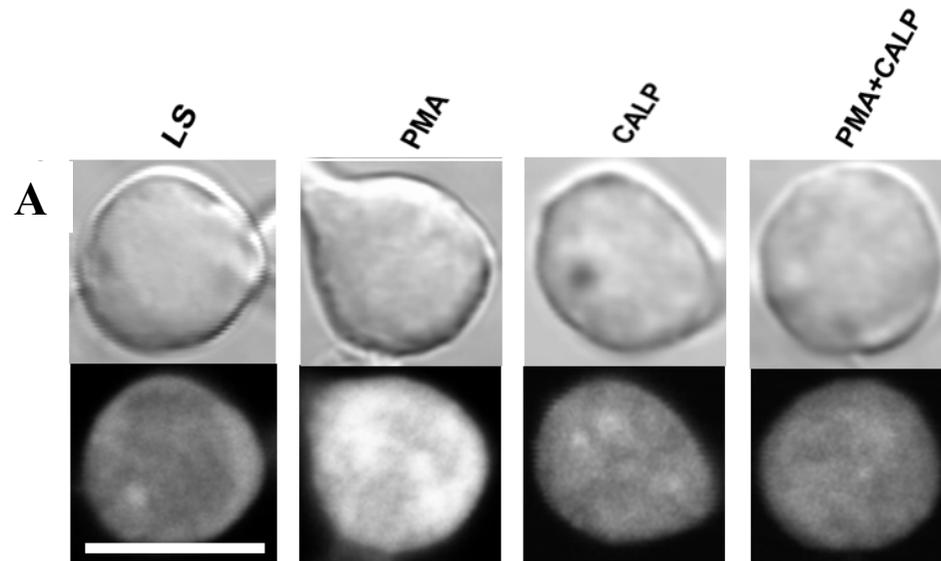


Figura 14: PKC Aumenta a Acidificação de Vesículas Sinápticas em Neurônios Bipolares da Retina. A) Terminais celulares representativos marcados com LS (100 nM) por 20 min (primeiro painel), pré-incubados com PMA 100 nM (segundo painel), CALP 100 nM (terceiro painel) e PMA+CALP (quarto painel). Fileira superior: imagens em luz transmitida. Fileira inferior: imagens em fluorescência. Barra de escala= 10 μ m. B) Histograma demonstrando que células expostas ao PMA apresentaram aumento da fluorescência de LS se comparado ao controle (* $P < 0,05$; $n = 9$) enquanto que grupos de células expostos à CALP ($P > 0,05$; $n = 9$), PMA+CALP ($P > 0,05$; $n = 9$), Staurosporine ($p > 0,05$; $n = 10$), Staurosporine + PMA ($P > 0,05$; $n = 9$) e 4 α -PMA ($P > 0,05$; $n = 8$) não obtiveram alterações estatisticamente significativas na fluorescência se comparados aos controles (barras brancas). As barras correspondem à média \pm erro padrão (SEM).

V.VI. Alterações na Acidificação e Conteúdo de Neurotransmissores em Vesículas Sinápticas não Interferem com o Tráfego Vesicular Normal.

Outro objetivo de nosso trabalho era investigar se alterações na acidificação de vesículas interferem com o tráfego vesicular por meio do imageamento com a sonda fluorescente FM1-43. Como já foi descrito anteriormente, o FM1-43 é bastante usado para monitorar o tráfego de VS em diversas modelos experimentais (Cochilla et al., 1999).

Vários autores buscaram elucidar se a reciclagem de VS, em diversos modelos experimentais, ocorre normalmente em condições nas quais o conteúdo quântico encontra-se reduzido ou totalmente depletado (Van der Kloot, 1987; Parsons et al., 1999). Assume-se que seria inviável, do ponto de vista energético, a exocitose de vesículas “vazias” ou parcialmente depletadas para a evocar resposta pós-sináptica e, um mecanismo regulador que selecionasse vesículas realmente preenchidas com neurotransmissores poderia estar presente no terminal pré-sináptico. Com o uso do FM1-43 poderíamos, portanto, elucidar se o tráfego de VS em determinadas condições em que o armazenamento e retenção de neurotransmissores estivessem prejudicados ocorreria ou não sem maiores alterações em nosso modelo experimental- os neurônios bipolares da retina, algo ainda não documentado.

Como já foi descrito anteriormente, o FM1-43 é bastante usado para se monitorar o tráfego de VS em diversas preparações (Cochilla et al., 1999) e possui como característica a marcação em membranas com índices de

fluorescência dezenas de vezes maiores se comparados à solução fisiológica. Além disso, essa sonda possui uma marcação reversível, sendo impermeável às membranas. Estas propriedades possibilitam-nos detectar ciclos de exocitose e endocitose *in vivo* (Betz e Bewick, 1992; Guatimosim e von Gersdorff, 2002; Holt et al., 2003).

Nos experimentos descritos a seguir, células bipolares foram perfundidas com a solução Fish Ringer (FR) modificada contendo 50 mM KCl, FM1-43 (4 μ M) e 0 mM Ca^{2+} por 2 min e as imagens foram capturadas utilizando o microscópio confocal. Como esperado, FM1-43 marcou apenas a membrana plasmática, não sendo captada para o interior da célula (Fig 15A). Posteriormente, as células foram estimuladas com a solução modificada mas na presença de 2.5 mM Ca^{2+} e, após 6 min, as imagens foram novamente coletadas. Como podemos visualizar na figura 15B, a internalização de FM1-43 ocorreu no terminal sináptico, onde se processam os ciclos de exo-endocitose, de forma difusa ao longo de todo terminal. O gráfico da figura 15C quantifica os valores de fluorescência de FM1-43 e ressalta que a internalização da sonda em terminais sinápticos ocorre na presença de Ca^{2+} .

Os resultados acima demonstram que, para haver marcação da sonda durante os 6 min de teste, houve exocitose e reciclagem das vesículas excitadas após estímulo despolarizante com KCl na presença de Ca^{2+} . O gráfico da figura 15C nos dá, portanto, uma medida indireta da exocitose e direta da endocitose em terminais de células bipolares sendo, portanto, utilizado para se investigar os ciclos de VS.

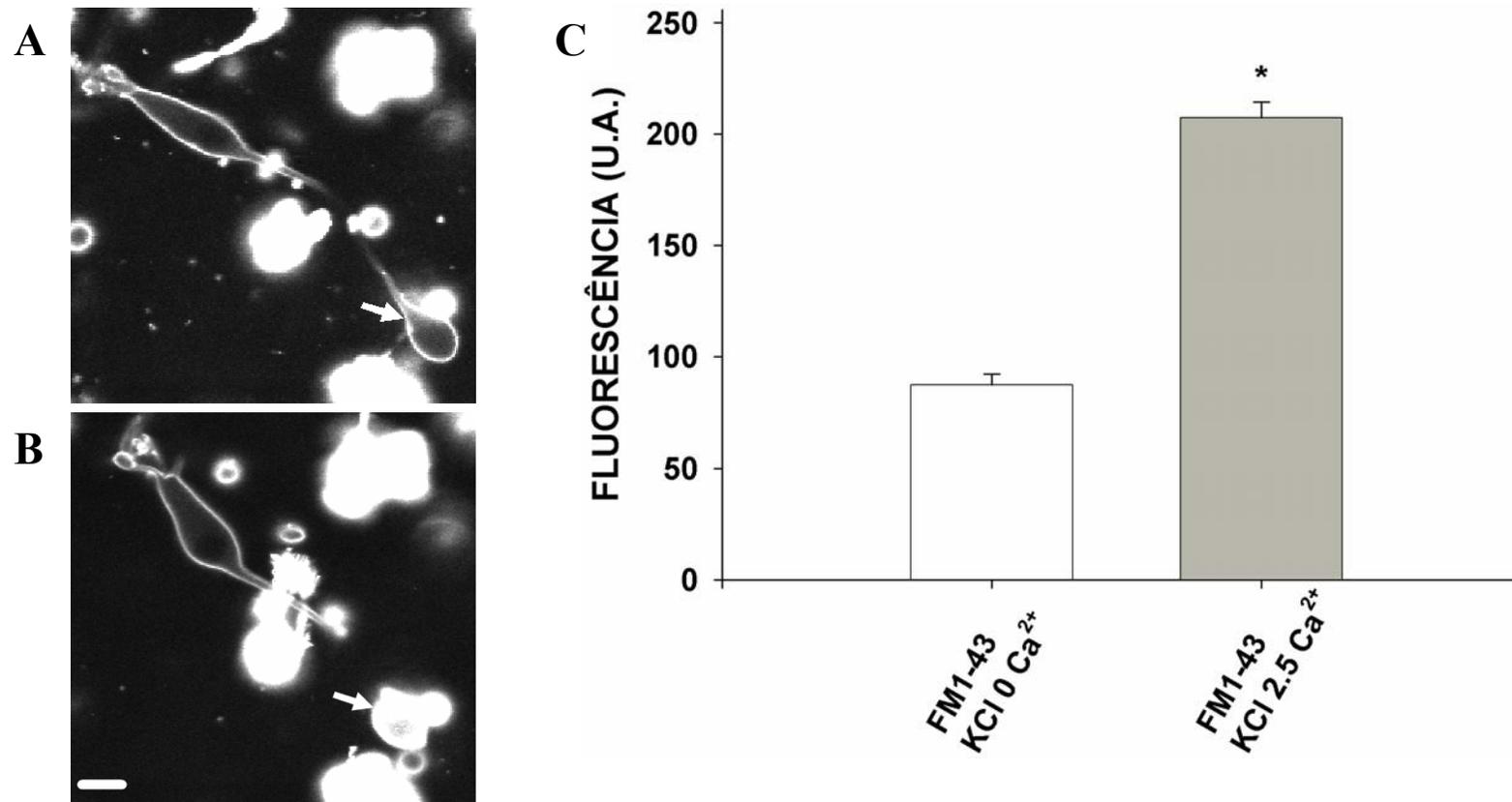


Figura 15: Marcação de FM1-43 em Células Bipolares da Retina. A) Imagem representativa de uma célula bipolar da retina isolada que foi perfundida por 2 min com FR contendo 50 mM KCl, 4 μ M FM1-43 e 0 mM Ca^{2+} . Note que a fluorescência está presente somente na membrana plasmática. B) Imagem da mesma célula após perfusão por 6min com FR contendo 50 mM KCl, 4 μ M FM1-43 and 2.5 mM Ca^{2+} . Houve marcação no interior do terminal o que representa internalização de VS (veja seta). Barra de escala= 10 μ m. C) Gráfico revela que há um aumento significativo ($P^* < 0,05$) na fluorescência dos terminais sinápticos após perfusão com FR com Ca^{2+} . $n=7$. As barras correspondem à média \pm erro padrão (SEM).

Nosso próximo passo foi observar se a acidificação de VS em terminais sinápticos de células bipolares, um processo fisiológico que pode evitar o efluxo de neurotransmissores e promover sua retenção em vesículas (Wolosker et al., 1996), é um requisito estritamente necessário para o tráfego das VS. Utilizamos, mais uma vez, as bases fracas permeáveis à membrana, Metilamina e NH_4Cl , que sabidamente colapsam o ΔpH das VS (veja figuras 6 e 13). Tal qual o controle, as células foram previamente perfundidas com solução contendo FM1-43 na ausência de Ca^{2+} por 2 min. A seguir, as células foram despolarizadas em solução modificada com Ca^{2+} por 6 min na presença de Metilamina (10 nM) e NH_4Cl (30 mM). Nenhuma das bases produziu quaisquer alterações significativas na marcação de FM1-43 em terminais bipolares (compare os painéis da esquerda e direita, Fig 16A). O histograma da figura 16B indica que os valores de marcação de FM1-43 foram similares para ambas condições se comparadas ao controle. Realizamos também experimentos com a Bafilomicina (500 nM), que bloqueia todo o $\Delta\mu\text{H}^+$ gerado pela H^+ -V-ATPase, e que impossibilita, portanto, a internalização de neurotransmissores nas VS. Realizamos os mesmos experimentos descritos acima para observarmos se o ciclo de VS “vazias” ocorre normalmente na presença de Bafilomicina. As figuras 16A, B revelam que, para também nessa condição experimental, o tráfego de VS visualizado a partir da fluorescência do FM1-43 ocorreu sem alterações estatisticamente significativas. Os resultados acima demonstram que a reciclagem de VS não acídicas e que (possivelmente) encontram-se com conteúdo vesicular reduzido ou totalmente depletado ocorre normalmente.

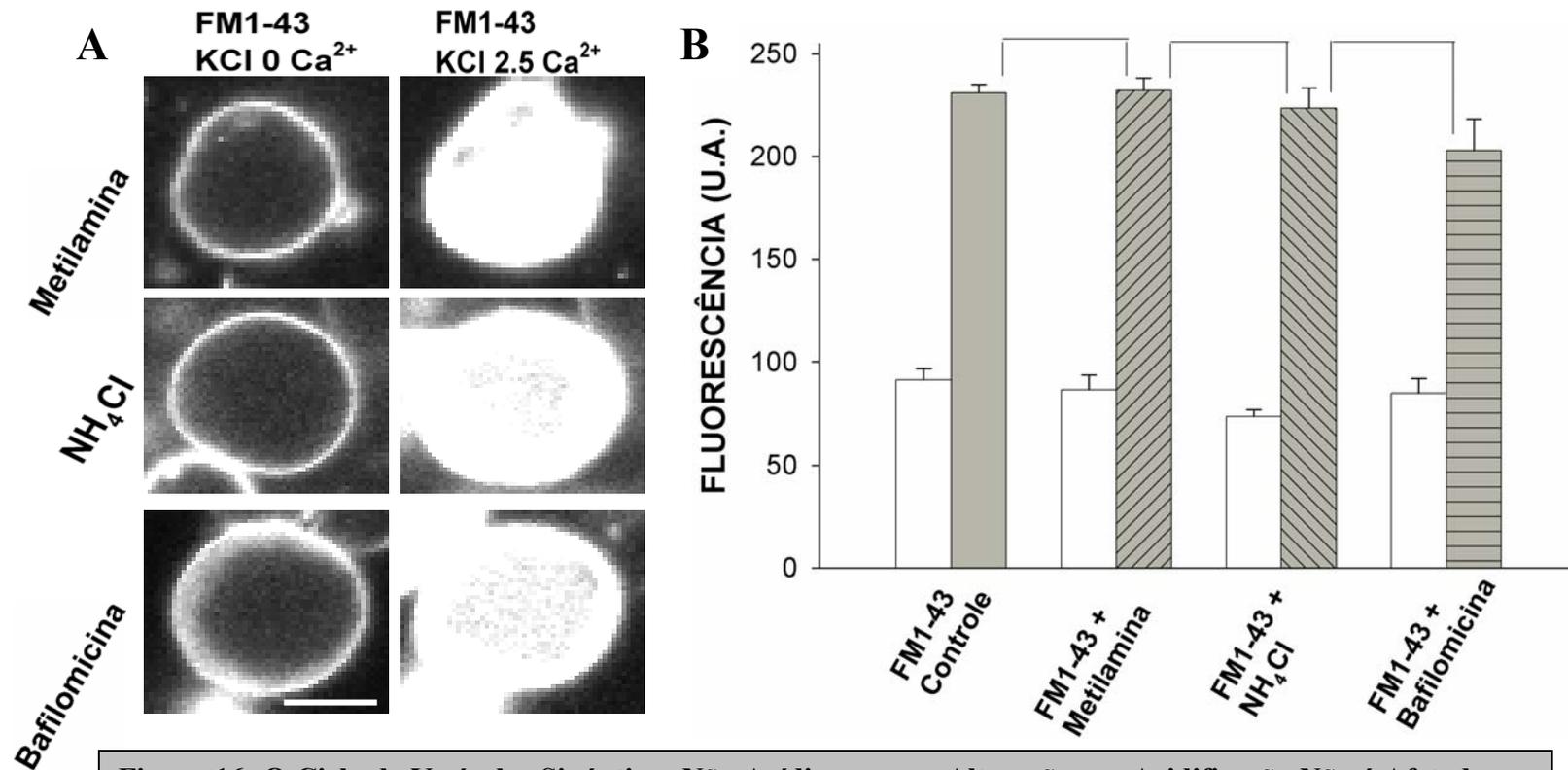


Figura 16: O Ciclo de Vesículas Sinápticas Não Acídicas e com Alterações na Acidificação Não é Afetado em Neurônios da Retina A) Imagens fluorescentes de células bipolares representativas expostas à Metilamina 10 nM (painel superior), NH₄Cl 30 mM (painel médio) e Bafilomicina 500 nM (painel inferior) e perfundidas por 2 min com FR contendo 50 mM KCl, 4 μM FM1-43 e 0 mM Ca²⁺ (quadros à esquerda). As mesmas células foram perfundidas por 6 min com FR contendo 50 mM KCl, 4 μM FM1-43 and 2.5 mM Ca²⁺ na presença contínua desses agentes farmacológicos. Barra de escala= 5 μm. C) Gráfico revela que não há diferenças estatísticas (P>0,05) na fluorescência dos terminais sinápticos após a marcação com FM1-43 nas 3 condições experimentais testadas (compare as barras cinzas). Controle n= 10; Metilamina n= 9; NH₄Cl n= 9; Bafilomicina n= 8. As barras correspondem à média ± erro padrão (SEM).

VI. Discussão

V.I. PKC modula a acidificação de vesículas sinápticas em terminais de neurônios bipolares

Em nosso trabalho, utilizamos as sondas fluorescentes LT e LS para detectar opticamente a acidificação de VS em terminais sinápticos de neurônios bipolares da retina de peixe-dourado. LT pode ser empregado com o intuito de se visualizar vesículas acídicas (Giner et al., 2007; Stenovec et al., 2007) ao passo que LS é mais indicado para se observar alterações sensíveis ao pH na acidificação de vesículas (Cousin & Nicholls, 1997).

Nós examinamos como sinalizações intracelulares, que reconhecidamente controlam a plasticidade sináptica por efeitos pré-sinápticos, podem modificar a fluorescência de LT. Preliminarmente, foi observado que inibidores de proteínas fosfatases aumentaram a fluorescência de LT. Como a fosforilação-desfosforilação são mecanismos interconectados, visamos elucidar qual(is) proteína(s) cinase(s) poderiam estar envolvidas nesse processo. A ativação de PKC, por meio de ésteres de forbol, aumentou a fluorescência de LT em células bipolares. Este efeito foi antagonizado pelo bloqueador específico de PKC, CALP. Por outro lado, fármacos que ativam ou inibem PKA e CaMKII não afetaram a fluorescência de LT, sugerindo que, mesmo numa sonda fluorescente não estritamente dependente de alterações no pH, o controle da acidificação de VS pode ser seletivamente regulado por

PKC. Confirmamos que a ativação de PKC aumenta a acidificação de VS de um modo pH-dependente, utilizando como ferramenta a sonda LS. Observou-se que a ativação de PKC por ésteres de forbol aumentou a fluorescência de LS e este efeito foi antagonizado pelos inibidores de PKC, CALP e STAU. Ainda, 4alpha-PMA não produziu alterações significativas na fluorescência de LS.

Já foi demonstrado que a ativação de PKC facilita a liberação de neurotransmissores em diversos tipos neuronais (vide Byrne & Kandell, 1996) e esta potencialização parece ocorrer devido à fosforilação de proteínas envolvidas na transmissão sináptica, notadamente nas proteínas relacionadas à dinâmica vesicular (Majewski et al., 1997; Majewski & Iannazzo, 1998). Um dos efeitos modulatórios advindos da ativação de PKC na facilitação secretória é a potencialização da liberação de neurotransmissores. Ésteres de forbol, tais como PMA, facilitaram a liberação de glutamato de células bipolares de peixe-dourado por uma potencialização seletiva do componente lento eletrofisiológico, uma etapa logo após à entrada de Ca^{2+} , o que resultou num aumento da quantidade total de transmissor liberado (Minami et al., 1998; Tachibana, 1999). O componente lento da liberação parece refletir o recrutamento de VS dos ribbons para as zonas ativas, então sugeriu-se que a potencialização da liberação de neurotransmissores pela aplicação de PMA poderia ocorrer devido à modificações do processo de recrutamento de vesículas em direção aos ribbons ou um aumento de vesículas conectadas aos ribbons (Mennerick & Matthews, 1996; von Gersdorff et al., 1996). Entretanto, a ativação de PKC potencializou o componente lento da transmissão sináptica mas aumentou a quantidade de fusão de VS

especificamente em regiões distantes de ribbons em neurônios bipolares (Midorikawa et al., 2007). Portanto, ainda não há consenso sobre os mecanismos responsáveis pela facilitação da liberação de neurotransmissores adquiridos após ativação de PKC.

A ativação de PKC também está envolvida na morfologia do citoesqueleto de actina em células bipolares já que ésteres de forbol aceleraram a polimerização de F-actina. No entanto, disrupção da F-actina obtida pela aplicação de citocalasina D não afetou o ciclo de VS (Job e Lagnado, 1998).

Além disso, PKC pode incrementar a liberação de neurotransmissores por regular o tamanho do pool de liberação rápido de VS. Stevens & Sullivan (1998) demonstraram que ésteres de forbol aumentaram o tamanho desse pool de liberação rápida e aceleraram o preenchimento de “locais vazios” de vesículas em sinapses hipocâmpais glutamatérgicas, contribuindo para uma potencialização sináptica. Ativação de PKC também aumentou o tamanho desse pool em células bipolares, um aumento mais restrito ao componente lento da exocitose e sem efeito significativo na endocitose (Berglund et al., 2002).

Assim, PKC parece atuar em distintos alvos a fim de facilitar a liberação de transmissores e essa cinase poderia participar em outras etapas anteriores à exocitose vesicular ainda não muito bem caracterizadas, incluindo as que envolvem internalização de neurotransmissores e acidificação de VS.

Em nosso estudo, reportamos que PKC modula a acidificação de vesículas em terminais de células bipolares e esses resultados podem ter

implicações diretas na potencialização da liberação de neurotransmissores obtida pela ativação de PKC. O transporte de glutamato para as VS é direcionado pelo $\Delta\mu\text{H}^+$ e parece que o $\Delta\Psi$ tem a função primária de internalizar o glutamato (Maycox et al., 1988; Tabb et al., 1992) e acumulá-lo em VS enquanto ΔpH é essencial para antagonizar o efluxo e reter o glutamato dentro das vesículas (Wolosker et al., 1996). Desse modo, sugerimos que alterações na acidificação de vesículas podem participar da liberação de neurotransmissores, talvez por diminuir o vazamento de glutamato nas VS o que, por sua vez, poderia contribuir para a potencialização da liberação de neurotransmissores e, em última análise, diminuir os níveis de glutamato citosólico do terminal pré-sináptico.

Uma possibilidade é que a entrada de Ca^{2+} nos terminais de células bipolares pode ativar PKC e assim, conduzir a um aumento da acidificação de VS. Este processo pode então proporcionar maiores níveis de glutamato nas VS de células bipolares da retina. Mecanismos que modulam o influxo de Ca^{2+} em terminais podem, indiretamente, potencializar a magnitude da resposta sináptica de acordo com a modulação do conteúdo quântico. Nossos achados então indicam que a acidificação de VS pode vir a ser um novo mecanismo de potencialização de sinapses glutamatérgicas.

V.II. Possíveis alvos de PKC no terminal de Células Bipolares

A busca pela proteína alvo de fosforilação e desfosforilação em VS de terminais de células bipolares não foi o objetivo principal de nosso trabalho, entretanto, deve-se ressaltar que 3 candidatos são os mais prováveis alvos desse processo: CLC-3, V-H+ATPase e V-GLUT. Apesar de uma recente análise proteômica não detectar a presença de canais de cloreto em VS purificadas de cérebros de ratos (Takamori et al., 2006), um estudo prévio demonstrou que um membro da família dos canais de cloreto (CLC-3) é fortemente expresso em cérebros de ratos (Stobrawa et al., 2001). Acidificação vesicular é aumentada por influxo de cloreto (Maycox et al., 1988) e se CLC realmente contribuem para a acidificação de VS, era de se esperar que um bloqueador específico desse canal deveria diminuir a fluorescência de LS. Entretanto, não foi observado alterações na fluorescência de LS na presença do bloqueador de canais de cloreto, NPPB (dados não apresentados). Sendo assim, talvez CLC não sejam necessários para o influxo de cloreto e, portanto, não regulariam a acidificação de VS em terminais de células bipolares da retina.

Outro candidato que pode controlar a acidificação de vesículas através da fosforilação é a V-H+ATPase. Apesar da enorme diversidade de funções que essa bomba possui, conhecimento sobre sua regulação, e em particular, sobre sua integração em redes de sinalização celular, é limitado (Forgac,

2000). Mesmo sendo possível identificar locais de consenso para a fosforilação de PKC em uma análise seqüencial, a fosforilação de subunidades da V-H⁺ATPase por proteínas cinases não foi demonstrado até hoje (Hong-Hermesdorf et al., 2006). Fosforilação pode alterar diretamente a atividade de V-H⁺ATPase (Arai et al., 1988), incrementando o transporte de prótons e, conseqüentemente, aumentando Δ pH. Portanto, a fosforilação da V-H⁺ATPase por PKC poderia ser um mecanismo possível envolvido no aumento da fluorescência de LS em VS dos neurônios bipolares.

Temos como outro alvo potencial para a fosforilação de PKC o VGLUT, o qual pertence à família de transportadores de fosfato do tipo 1 e possuem 3 isoformas (veja a introdução para mais detalhes). Análise para a topologia de membrana de VGLUT2 revelou sítios potenciais para a fosforilação de PKC e caseína cinase II, o que poderia regular a atividade de transporte e tráfego (Jung et al., 2006; Fei et al., 2007). Aumento na acidificação induzida por glutamato foi detectada em VS (Maycox et al., 1988) e microvesículas de pinealócitos de glândulas pineais bovinas (Moryiama e Yamamoto, 1995), sugerindo que um aumento na atividade de transporte poderia resultar num aumento de Δ pH. Aliás, VGLUT e PKC colocalizam-se em terminais de células bipolares da retina de roedores (Johnson et al., 2003). Dessa forma, fosforilação de VGLUT por PKC pode ser outro mecanismo responsável pelo aumento da fluorescência de LS em neurônios bipolares da retina.

V.III. Tráfego de Vesículas Sinápticas em Condições que Alteram o Gradiente Próton-Eletroquímico

Células bipolares da retina e outras sinapses sensoriais do tipo ribbon possuem uma maquinaria pré-sináptica especializada para transmitir neurotransmissores de forma rápida e tônica, em contraste aos neurônios cerebrais convencionais. Enquanto estes promovem a liberação de transmissores num curto espaço de tempo a partir de potenciais de ação de um modo “ou tudo ou nada”, aquelas células não disparam potenciais de ação, mas transmitem informação a partir de alterações graduadas no potencial de membrana. A neurotransmissão é dependente de Ca^{2+} e as proteínas envolvidas no ciclo da VS parecem ser conservadas para ambos tipos celulares (Morgans, 2000).

O neurônio bipolar da retina deve liberar tonicamente neurotransmissores durante despolarizações continuadas de potencial de membrana a fim de manter a fidedignidade da resposta sináptica. Numa condição na qual há o bloqueio do tráfego de VS ou a indisponibilidade de neurotransmissores em vesículas, a resposta pós-sináptica não será evocada e certamente ocorrerá paralisia da neurotransmissão.

A fim de se estudar a reciclagem de VS com conteúdo vesicular reduzido, utilizamos a sonda fluorescente FM1-43 para marcação de vesículas e monitoramento do ciclo sináptico em células bipolares da retina. A molécula

de FM1-43 é anfipática e apresenta afinidade pela membrana celular devido à sua cauda hidrofóbica, possibilitando que o marcador seja captado pelas vesículas durante a endocitose e que a marcação no terminal sináptica possa ser visualizada pela microscopia confocal. Temos então que, numa célula bipolar marcada com FM1-43 em solução desprovida de Ca^{2+} , a sonda marca a membrana celular sem, contudo, ser internalizada no terminal sináptico. Após despolarização com solução de alta concentração de KCl na presença de Ca^{2+} , ocorre aumento de fluorescência no terminal, refletindo a presença de ciclos de exocitose e endocitose. Assim como outros grupos de pesquisadores, não conseguimos promover a desmarcação do terminal de células bipolares marcadas com FM1-43. Possivelmente, isso ocorreu devido ao fato de vesículas recém-endocitadas constituírem o pool de reserva de VS e não o pool de liberação rápido (Rizzoli & Betz, 2005). Assim, as vesículas daquele pool não seriam liberadas em um novo estímulo despolarizante sendo preferencialmente liberadas as VS conectadas às fitas sinápticas. De fato, apenas um grupo de pesquisadores conseguiu observar a exocitose de VS em células bipolares da retina (Lagnado et al., 1996; Holt et al., 2003).

Betz e colegas (1992, 1993) demonstraram que FM1-43 acumula-se em VS que sofreram reciclagem via endocitose. Foi concluído que a extensão de endocitose é dependente da quantidade prévia de exocitose e, portanto, os índices de endocitose são fortemente relacionados aos de exocitose (Wu & Betz, 1996). Desse modo, a marcação do terminal da célula bipolar reflete a presença de exocitose e endocitose de VS e podemos então inferir se houve o tráfego normal de vesículas comparando-se a magnitude de marcação do terminal em diversas situações experimentais.

Acredita-se que 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 a atividade e maturação de pró-hormônios (Blackmore et al., 2001). Durante os ciclos de exocitose/endocitose, as VS perdem seu conteúdo ácido (i.e., prótons) e devem ser reacidificadas para se prepararem para um novo ciclo. A reacidificação poderia ser um fator limitante para todo o ciclo sináptico (Melnik et al., 2001).

A partir disso, utilizamos drogas que depletam indiretamente o conteúdo vesicular de glutamato- Bafilomicina, e que abolem a acidificação vesicular e contribuem para o efluxo do neurotransmissor- como o NH_4Cl e Metilamina. A Bafilomicina é uma toxina microbiana que bloqueia especificamente a $\text{V-H}^+\text{ATPase}$ e colapsa, conseqüentemente, o $\Delta\mu\text{H}^+$. De fato, a redução do conteúdo quântico de glutamato em VS de neurônios hipocâmpais após exposição à Bafilomicina podem ser evidenciados pela redução da amplitude e frequência dos MEPPs (Zhou et al., 2000).

Metilamina e NH_4Cl , por sua vez, são bases fracas permeáveis à membrana que aumentam o pH intravesicular e colapsam o ΔpH . A primeira base apresenta uma forma não protonada que difunde-se passivamente através de membranas sem comprometer $\Delta\Psi$ (Cousin & Nicholls, 1997). NH_4Cl , no entanto, produz pequenas quantidades de NH_3 em grânulos secretórios catecolaminérgicos os quais se combinam com prótons para formar NH_4^+ , diminuindo assim a acidez do interior desses grânulos (Carmichael & Winkler, 1985).

Por meio de ensaios fluorimétricos, procuramos mensurar a quantidade de glutamato liberado pela retina em condições em que esta era pré-incubada com os agentes farmacológicos acima citados. Ayoub & Dorst (1998) visualizaram a liberação de glutamato endógeno nas camadas OPL e IPL em fotorreceptores e células bipolares da retina de peixe-dourado e pretendíamos, portanto, quantificar o glutamato liberado através da despolarização com KCl em situações as quais temos o $\Delta\mu\text{H}^+$ alterado e confirmar se essas drogas realmente modificavam o conteúdo quântico das VS. Infelizmente, mesmo utilizando-se várias retinas em cada experimento, valores perceptíveis de glutamato eram dificilmente detectados e mesmo quando eram, grande variabilidade nas medidas eram encontradas.

Em nossos experimentos, não foram observadas alterações significativas no tráfego de vesículas em células incubadas com Bafilomicina, Metilamina e NH_4Cl . Estes resultados estão de acordo com vários estudos que demonstraram previamente que o transporte de diversos neurotransmissores para as VS de neurônios convencionais não é uma etapa estritamente necessária para ciclos repetidos de exocitose e reciclagem de vesículas durante estímulos prolongados (Cousin & Nicholls, 1997; Parsons et al., 1999; Zhou et al., 2000).

Em nossos estudos, seguimos o protocolo descrito por Cousin e Nicholls (1997). Estes autores foram os primeiros a investigar se vesículas glutamatérgicas “vazias” continuam competentes para os ciclos de exocitose e endocitose em determinadas condições em que a quantidade de neurotransmissores encontra-se reduzida ou abolida. Como já foi descrito

anteriormente (veja a introdução deste trabalho), para a internalização de glutamato em VS é necessário o $\Delta\mu H^+$ mas a entrada desse neurotransmissor, em contraste à acetilcolina, é diretamente dependente de $\Delta\Psi$ se comparado à ΔpH . Este é mais relacionado à diminuição do efluxo de glutamato das VS (Wolosker et al., 1996). Sendo assim, os autores incubaram células granulares cerebelares em cultura com Metilamina e Bafilomicina. Esses procedimentos assegurariam que as VS estivessem com o conteúdo de glutamato reduzido (na incubação com Metilamina) ou abolido (com Bafilomicina), o que de fato foi confirmado através de mensurações na liberação de aspartato. Por meio de FM2-10, um análogo de FM1-43, os pesquisadores observaram que a ciclagem de VS opera normalmente mesmo se essas vesículas não se encontrarem totalmente preenchidas.

Os resultados de Parsons et al (1999) também corroboram nossos achados, mas dessa vez, para um modelo de terminações colinérgicas motoras. Utilizando-se vesamicol, um bloqueador específico do transportador de acetilcolina (ACh), os autores evidenciaram uma inibição da liberação evocada de ACh, também observada em outros modelos experimentais (Prado et al., 1990; Van der Kloot et al., 2000). Obtinha-se, portanto, depleção dos estoques pré-formados de ACh e redução da correntes pós-sinápticas. Não se sabia, entretanto, se VS colinérgicas recicladas e não preenchidas com ACh poderiam participar de novos ciclos de exocitose e endocitose. Utilizando FM1-43 para monitorar o ciclo normal das VS em terminais nervosos motores de cobra, os pesquisadores não observaram alterações nos ciclos de exocitose e endocitose de VS tratadas com vesamicol durante estimulação prolongada com solução com alto KCl.

Neste trabalho, realizamos experimentos com Rose Bengal, o bloqueador de VGLUT disponível no mercado. Nossa hipótese era que, células incubadas com essa droga teriam VS completamente carentes de glutamato e poderíamos aferir diretamente o ciclo de VS “vazias”. Rose Bengal, no entanto, além de causar morte celular (facilmente observada pela dilatação dos dendritos neuronais, granulações no núcleo e terminal sináptico), é derivado da fluoresceína e causa autofluorescência elevada. Grandes variações na fluorescência controle e morte celular inviabilizaram o prosseguimento de nossos experimentos com esse fármaco.

Como já foi mencionado anteriormente, a maquinaria exo-endocítica vesicular opera normalmente em vesículas “vazias” ou parcialmente depletadas de neurotransmissores, pelo menos para o nosso protocolo de marcação. Como então alterações na acidificação vesicular e preenchimento de neurotransmissores poderia afetar o tráfego de VS? Pollard et al (1979) foram os primeiros a estabelecer a hipótese de que o pH ácido contribui para o processo de fusão, hipótese esta logo rejeitada por Knight e Baker (1985). Entretanto, os estudos de Pollard e colegas foram realizados medindo-se o total de catecolaminas no meio ao redor de milhões de células “cromafin”. Outros autores re-examinaram, portanto, o papel do pH intravesicular na regulação da cinética de liberação de um único grânulo, um processo mais fidedigno (Camacho et al., 2006). Os estudos destes pesquisadores revelaram que a Bafilomicina, NH₄Cl e outros tratamentos que reduzem o pH vesicular resultam em desaceleração da exocitose. A alcalinização também diminuiu o conteúdo quântico de toda a população de vesículas dos grânulos secretórios. Sendo assim, a acidificação vesicular parece acelerar a exocitose, promovendo

maiores quantidades de neurotransmissores nos receptores pós-sinápticos (Camacho et al., 2006).

Nosso protocolo foi baseado no modelo pré-estabelecido de Guatimosim e colaboradores (2002) e em dados de capacitância de membrana (von Gersdorff et al., 1996), os quais representam modelos para estudos que visam estudar o tráfego de vesículas em células bipolares. A marcação inicia-se logo após o estímulo despolarizante com KCl mas efetiva-se num período de tempo de (6) minutos. Sendo assim, nosso modelo evidencia o tráfego normal de vesículas num período de tempo em que se desenvolve a exocitose em células bipolares mas não fornece informações acerca da desaceleração da exocitose em células tratadas com Bafilomicina, Metilamina e NH₄Cl. É possível que, num período de tempo mais curto, tenham ocorrido certas diferenças estatísticas entre a marcação de células bipolares controle *versus* tratadas. Porém, nosso modelo de marcação com FM1-43 não seria capaz de detectar variações cinéticas ultra-rápidas de marcação, requerendo uma metodologia mais acurada, como a eletrofisiologia ou mesmo a capacitância de membrana. Além disso, talvez a exocitose de vesículas catecolaminérgicas, normalmente granulares, seja influenciada de uma maneira diferente por alterações no pH intravesicular se comparada com a exocitose de vesículas agranulares glutamatérgicas ou colinérgicas, que não sofrem alteração como mostrado nessa tese e por outros autores (Lagnado et al., 1996; Von Gersdorff et al., 1998; Camacho et al., 2006).

VII. Conclusão

Este estudo demonstra opticamente que mecanismos de sinalização intracelulares podem regular a acidificação de VS em neurônios bipolares da retina. Assim, fosforilação de um alvo protéico distinto por PKC promoveria uma aumento de ΔpH e, considerando que esse gradiente é essencial para antagonizar o efluxo de glutamato, nós propomos que o aumento da acidificação induzido por PKC pode interferir com a retenção de glutamato nas VS. Esse processo certificaria que maiores quantidades de neurotransmissores chegassem a seus alvos sinápticos e contribuiria para uma maior eficácia da resposta pós-sináptica.

Nossos dados sobre o tráfego vesicular de vesículas “vazias” ou com conteúdo quântico reduzido revelam que a probabilidade de reciclagem de VS parece ser inteiramente independente do estado de preenchimento da vesícula. Desse modo, mecanismos fisiológicos celulares poderiam operar em células neuronais a fim de regular a quantidade de neurotransmissores em vesículas através de variações de componentes do $\Delta\mu\text{H}^+$, estabelecendo, portanto, a magnitude ideal da resposta sináptica. Esses dados abrem campo para pesquisas nas quais a modulação da quantidade de neurotransmissores em VS se dá através de meios indiretos e fisiológicos e, poderia estabelecer alvos interessantes para a ação de drogas e fármacos em médio prazo. Finalmente, os achados apresentados nesse trabalho contribuem para uma maior compreensão do sistema glutamatérgico, de extrema relevância para diversas patologias clínicas.

VIII-Referências Bibliográficas

Arai H, Terres G, Pink S et al., 1988. Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J Biol Chem.* 263: 8796-8802.

Atluri PP & Ryan TA., 2006. The kinetics of synaptic vesicle reacidification at hippocampal nerve terminals. *J Neurosci.* 26:2313-20.

Awatramani GB & Slaughter MM, 2001. Intensity-dependent, rapid activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors at a central synapse. *J Neurosci.* 21:741-749.

Ayoub GS & Dorst K, 1998. Imaging of glutamate release from the goldfish retinal slice. *Vision Res.* 38:2909-12.

Barasch J, Gershon MD, Nunez EA et al., 1988. Thyrotropin induces the acidification of the secretory granules of parafollicular cells by increasing the chloride conductance of the granular membrane. *J Cell Biol.* 107:2137-2147.

Bellocchio EE, Hu H, Pohorille A. et al., 1998. The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporters suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J. Neurosci.* 18:8648–8659.

Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau Jr. RT et al., 2000. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*. 289:957–960.

Berglund K, Midorikawa M, Tachibana M, 2002. Increase in the pool size of releasable synaptic vesicles by the activation of protein kinase C in goldfish retinal bipolar cells. *J Neurosci*. 22:4776-85.

Berntson AK & Morgans CW, 2003. Distribution of the presynaptic calcium sensors, synaptotagmin I/II and synaptotagmin III, in the goldfish and rodent retinas. *J Vis*. 3:274-80.

Betz WJ, Mao F, Bewick GS, 1992. Activity dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosci*. 12:363-375.

Betz WJ, Mao F, Smith CB, 1996. Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol*. 6:365-71.

Betz WJ & Angleson JK, 1998. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Physiol* 60:347-363.

Blackmore CG, Varro A, Dimaline R et al., 2001. Measurement of secretory vesicle pH reveals intravesicular alkalization by vesicular monoamine transporter type 2 resulting in inhibition of prohormone cleavage. *J Physiol.* 531:605-17.

Brumback AC, Lieber JL, Angleson JK et al., 2004. Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis *Methods.* 33:287-94.

Byrne JH & Kandel ER, 1996. Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci.* 16:425-35.

Calakos N & Scheller RH, 1996. Synaptic vesicles biogenesis, docking and fusion: A molecular description. *Physiol Rev.* 76:1-29

Camacho M, Machado JD, Montesinos MS et al., 2006. Intragranular pH rapidly modulates exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurochem.* 96:324-334.

Carmichael SW & Winkler H, 1985. The adrenal chromaffin cell. *Sci Am.* 253:40-9.

Ceccarelli B, Hulburt WP, Mauro A, 1973. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol.* 57: 499-524.

Chapman ER, 2002. Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? Nat Rev Mol Cell Biol. 3:498-508.

Cochilla AJ, Angleson JK, Betz WJ, 1999. Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. Annu Rev Neurosci. 22:1-10.

Colbran RJ, 2004. Protein phosphatases and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent synaptic plasticity. J Neurosci. 39: 8404-9.

Cousin MA & Nicholls DG, 1997. Synaptic vesicle recycling in cultured cerebellar granule cells: role of vesicular acidification and refilling. J Neurochem. 69:1927-35.

Cremona O & De Camilli P, 1997. Synaptic vesicle endocytosis. Curr Opin Neurobiol. 7:323-330.

Danbolt NC, 2001. Glutamate uptake. Prog Neurobiol. 1:1-105.

Daniels RW, Collins CA, Chen K et al., 2006. A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. Neuron. 49:11-6.

De Camilli P & Takei K, 1996. Molecular mechanisms in synaptic vesicle recycling and endocytosis. Neuron. 16:481-6.

Delgado R, Maureira C, Oliva C et al., 2000. Size of vesicle pools, rates of mobilization, and recycling at neuromuscular synapses of a *Drosophila* mutant, *shibire*. *Neuron* 3:341-53.

Dick O, Hack I, Altroch WD et al., 2001. Localization of the presynaptic cytomatrix protein Piccolo at ribbon and conventional synapses in the rat retina: comparison with Bassoon. *J Comp Neurol.* 439:224-34.

Drose S & Altendorf K, 1997. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol.* 200:1-8.

Fei H, Karnezis T, Reimer RJ et al., 2007. Membrane topology of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter. *J Neurochem.* 101:1662-71.

Fischer A, Sananbenesi F, Spiess J et al., 2003. Cdk5: a novel role in learning and memory. *Neurosignals.* 4-5:200-8.

Forgac M, 2000. Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar H(+)-ATPases. *J Exp Biol.* 203:71-80.

Fox MA & Sanes JR, 2007. Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses. *J Comp Neurol.* 503:280-96.

Freneau Jr. RT, Troyer MD, Pahner I et al., 2001. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*. 31:247–260.

Fried RC & Blaustein MP, 1978. Retrieval and recycling of synaptic vesicle membrane in pinched-off nerve terminals (synaptosomes). *J Cell Biol*. 78:685-700.

Fykse EM & Fonnum F, 1996. Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. *Neurochem Res*. 21:1053-60.

Gasnier B, 2000. The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie*. 82:327-337.

Geppert M, Goda Y, Hammer RE et al., 1994. Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse *Cell*. 4:707-17.

Giner D, López I, Villanueva J et al., 2007. Vesicle movements are governed by the size and dynamics of F-actin cytoskeletal structures in bovine chromaffin cells. *Neuroscience*. 146:659-669.

Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ et al., 1993. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science*. 259:780-85.

Guatimosim C, Romano-Silva MA, Gomez MV et al., 1998. Recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction in the presence of strontium. *J Neurochem.* 70:2477-2483.

Guatimosim C & von Gersdorff H, 2002. Optical monitoring of synaptic vesicles trafficking in ribbon synapses *Neurochemistry International* 41:307-310.

Guatimosim C, Hull C, von Gersdorff H, et al., 2002. Okadaic acid disrupts synaptic vesicle trafficking in a ribbon-type synapse. *Journal of Neurochem.* 82:1047-1057.

Headley PM & Grillner S, 1990. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci.* 5:205-11.

Heidelberger R, Thoreson WB, Witkovsky P, 2005. Synaptic transmission at retinal ribbon synapses. *Prog Retin Eye Res.* 24:682-720.

Herzig S & Neumann J, 2000. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes *Physiol Rev.* 80:173-210.

Herzog E, Bellenchi GC, Gras C et al., 2001. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci.* 21:RC181.

Heuser JE & Reese TS, 1973. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol.* 57:315-44.

Hirokawa N & Takemura R, 2004. Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp Cell Res.* 1:50-9.

Holt M, Cooke A, Wu MM et al., 2003. Bulk membrane retrieval in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *J Neurosci.* 23:1329-39.

Hong-Hermesdorf A, Brück A, Grüber A et al., 2006. A WNK kinase binds and phosphorylates V-ATPase subunit C. *FEBS Lett.* 580:932-939.

Huang P, Liu J, Di A, et al., 2001. Regulation of human CLC-3 channels by multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase *J Biol Chem.* 276:20093-100.

Ingebritsen TS & Cohen P, 1983. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science*. 221:331-8.

Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y et al., 1999. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:8733-8.

Jackson MB & Chapman ER, 2008. The fusion pores of Ca(2+)-triggered exocytosis. *Nat Struct Mol Biol*.15:684-689.

Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F et al., 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*. 82:503-568.

Job C & Lagnado L, 1998. Calcium and protein kinase C regulate the actin cytoskeleton in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *J Cell Biol*. 143:1661-72.

Johnson J, Tian N, Caywood MS et al., 2003. Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina: GABA and glycine precede glutamate. *J Neurosci*. 23:518-29.

Jung SK, Morimoto R, Otsuka M et al., 2006. Transmembrane topology of vesicular glutamate transporter 2. *Biol Pharm Bull.* 29:547-549.

Katz B & Miledi R, 1966. Release of acetylcholine from a nerve terminal by electric pulses of variable strength and duration. *Nature.* 207:1097-8.

Katz B & Miledi R, 1969. Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. *J Physiol.* 203:689-706.

Kawai F & Sterling P, 1999. AMPA receptor activates a G-protein that suppresses a cGMP-gated current. *J Neurosci.* 19:2954-9.

Knight DE & Baker PF, 1985. The chromaffin granule proton pump and calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells. *J Membr Biol.* 83:147-56.

Kobayashi E, Ando K, Nakano H et al., 1989. Calphostins (UCN-1028), novel and specific inhibitors of protein kinase C. I. Fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot (Tokio).* 42:1470-1474.

Kosaka T & Ikeda K, 1983. Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in *Drosophila*. *J Neurobiol.* 14:207-25.

Kuromi H & Kidokoro Y, 1998. Two distinct pools of synaptic vesicles in single presynaptic boutons in a temperature-sensitive *Drosophila* mutant, *shibire*. *Neuron.* 20:917-925.

Lagnado L, Gomis A, Job C, 1996. Continuous vesicle cycling in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron.* 17:957-67.

Leenders A.G & Sheng ZW, 2005. Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases: implications for presynaptic plasticity. *Pharmacol Ther.* 105:69-84.

Lenzi D, Runyeon JW, Crum J et al., 1999. Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography *J Neurosci.* 19:119-32.

Lenzi D & von Gersdorff H, 2001. Structure suggests function: the case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines. *BioEssays.* 23:831-840.

Li Z & Murthy VN, 2001. Visualizing postendocytic traffic of synaptic vesicles of hippocampal synapses. *Neuron.* 31:593-605.

Lichtman JW, Wilkinson RS, Rich MM, 1985. Multiple innervation of tonic endplates revealed by activity-dependent uptake of fluorescent probes. *Nature*. 314:357-9.

Liu Y & Edwards RH, 1997. The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neurodegeneration. *Ann Rev Neurosci*. 20:125-56.

Majewski H, Kotsonis P, Iannazzo L et al., 1997. Protein kinase C and transmitter release. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 24:619-23.

Majewski H & Iannazzo L, 1998. Protein kinase C: a physiological mediator of enhanced transmitter output. *Prog. Neurobiol*. 55:463-75.

Marshak DW & Dowling JE, 1987. Synapses of cone horizontal cell axons in goldfish retina. *J Comp Neurol*. 256:430-43.

Masland RH, 2001. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol*. 11:431-6.

Matthews G & Sterling P, 2008. Evidence that vesicles undergo compound fusion on the synaptic ribbon. *J Neurosci*. 28:5403-11.

Maycox PR, Hell JW, Jahn R, 1988. Amino acid neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. *TINS* 13:83-87.

Mayford M, Wang J, Kandel ER et al., 1995. CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. *Cell*. 81:891-904.

Melnik VI, Bikbulatova LS, Gulyaeva NV et al., 2001. Synaptic vesicle acidification and exocytosis studied with acridine orange fluorescence in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res*. 26:549-54.

Mennerick S & Matthews G, 1996. Ultrafast exocytosis elicited by calcium current in synaptic terminals of retinal bipolar neurons. *Neuron*. 17:1241-9.

Midorikawa M, Tsukamoto Y, Berglund K et al., 2007. Different roles of ribbon-associated and ribbon-free active zones in retinal bipolar cells. *Nat Neurosci*. 10:1268-76.

Minami N, Berglund K, Sakaba T et al., 1998. Potentiation of transmitter release by protein kinase C in goldfish retinal bipolar cells. *J Physiol*. 512:219-25.

Morgans CW, 2000. Neurotransmitter release at ribbon synapses in the retina. *Immunol Cell Biol*. 78:442-6.

Moriyama Y & Futai M, 1990. H (+)-ATPase, a primary pump for accumulation of neurotransmitters, is a major constituent of brain synaptic vesicles. *Biochem Biophys Res Commun.* 173:443-8.

Moriyama Y & Yamamoto A., 1995. Microvesicles isolated from bovine pineal gland specifically accumulate L-glutamate. *FEBS Lett.* 367:233-236.

Mulberg AE, Tulk BM, Forgac M, 1991. Modulation of coated vesicle chloride channel activity and acidification by reversible protein kinase A-dependent phosphorylation. *J Biol Chem.* 266:20590-3.

Munton RP, Vizi S, Mansuy IM, 2004. The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Lett.* 567: 121-8.

Murthy VN & De Camilli P, 2003. Cell biology of the presynaptic terminal *Annu Rev Neurosci.* 26:701-28.

Naito S & Ueda T, 1985. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem.* 44:99-109.

Nathans J, 1999. The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments. *Neuron.* 24:299-312

Nelson N, 1992. The vacuolar H⁺ ATPase- one of the most fundamental ion pumps in the nature. *J Ex Biol.* 172:205-18.

Ni B, Rosteck Jr. PR, Nadi NS et al., 1994. Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na⁽⁺⁾-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91:5607–5611.

Nishi T & Forgacs M, 2002. The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:94-103.

Ozkan ED & Ueda T, 1998. Glutamate transport and storage in synaptic vesicles. *Jpn J Pharmacol.* 77:1-10.

Ottersen OP, Laake JH, Reichelt W et al., 1996. Ischemic disruption of glutamate homeostasis in brain: quantitative immunocytochemical analyses. *J Chem Neuroanat.* 12:1-14.

Palmer MJ, Hull C, Vigh J et al., 2003. Synaptic cleft acidification and modulation of short-term depression by exocytosed protons in retinal bipolar cells. *J Neurosci.* 23:11332-41.

Pan ZH & Hu HJ, 2000. Voltage-dependent Na(+) currents in mammalian retinal cone bipolar cells. *J Neurophysiol.* 84:2564-71.

Parsons SM, Calupca MA., Merriam LA. et al., 1999. Empty Synaptic Vesicles Recycle and Undergo Exocytosis at Vesamicol-Treated Motor Nerve Terminals. *J Neurophysiol.* 81:2696–2700.

Parsons TD & Sterling P, 2003. Synaptic ribbon. Conveyor belt or safety belt? *Neuron.* 37:379-82.

Pfenninger K, Sandri C, Akert K et al., 1969. Contribution to the problem of structural organization of the presynaptic area. *Brain Res.* 1:10-8.

Pieribone VA, Shupliakov O, Brodin L et al., 1995. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature.* 375:493-497.

Pollard HB, Shindo H, Creutz CE et al., 1979. Internal pH and state of ATP in adrenergic chromaffin granules determined by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem.* 254:1170-7.

Pothos EN, Larsen KE, Krantz DE et al., 2000. Synaptic vesicle transporter expression regulates vesicle phenotype and quantal size. *J Neurosci.* 20:7297–7306.

Prado MA., Santos TM, Gomez MV et al., 1990. 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 braincortical slices. *Neurosci Lett.* 111:195-200.

Pyle JL, Kavalali ET, Piedras-Renteria ES et al., 2000. Rapid reuse of readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron.* 28:221-231.

Richards DA, Guatimosim C, Betz WJ, 2000. Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron.* 27:551-559.

Ribchester RR, Mao F, Betz WJ, 1994. Optical measurements of activity-dependent membrane recycling in motor nerve terminals of mammalian skeletal muscle. *Proc Biol Sci.* 255:61-6.

Richards DA, Guatimosim C, Rizzoli SO et al., 2003. Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron.* 39:529-41.

Rizzolli SO & Betz WJ, 2005. Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci.* 6:57-69.

Roseth S, Fykse EM, Fonnum F, 1995. Uptake of L-glutamate in rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J Neurochem* 65: 96-103.

Rothman JE, 1990. The reconstitution of intracellular protein transport in cell-free systems. *Harvey Lect.* 86:65-85.

Royle SJ & Lagnado L, 2003. Endocytosis at the synaptic terminal. *J Physiol.* 553:345-355.

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

Ryan TA & Reuter H, 2001. Measurements of vesicle recycling in Central Neurons. *News Physiol Sci.* 16:10-4.

Sankaranarayanan S & Ryan TA, 2000. Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nat Cell Biol.* 2:197-204.

Schiavo G, Stenbeck G, Rothman JE, Söllner TH, 1997. Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:997-1001.

Shupliakov O, Bloom O, Gustafsson JS et al., 2002. Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22:14476-81.

Smythe E & Warren G, 1991. The mechanism of receptor-mediated endocytosis. *Eur J Biochem.* 202:689-99.

Soderling TR & Derkach VA, 2000. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci.* 2:75-80.

Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW et al., 1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell.* 3:409-18.

Stenovec M, Kreft M, Grilc S et al., 2007. Ca²⁺-dependent mobility of vesicles capturing anti-VGLUT1 antibodies. *Exp Cell Res.* 313:3809-18.

Stevens TH & Forgac M, 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:779-808.

Stevens CF & Sullivan JM, 1998. Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron.* 21:885-893.

Stevens CF, 2003. Neurotransmitter release at central synapses. *Neuron.* 40:381-8.

Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S et al., 2001. Disruption of CLC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron*. 29:185-196.

Sudhof TC, 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*. **27**: 509-47
Tachibana M (1999). Regulation of transmitter release from retinal bipolar cells. *Prog Biophys Mol Biol*. 72:109-33.

Tabb JS, Kish PE, Van Dyke R et al., 1992. Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem*. 267:15412-15418.

Tachibana M & Okada T, 1991. Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina *J Neurosci*. 11:2199-208.

Tachibana M, Okada T, Arimura T et al., 1993. Dihydropyridine-sensitive calcium current mediates neurotransmitter release from bipolar cells of the goldfish retina. *J Neurosci* 13:2898-909.

Tachibana M, 1999. Regulation of transmitter release from retinal bipolar cells. *Prog Biophys Mol Biol*. 72:109-33.

Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C et al., 2000. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*. 407:189-94.

Takamori S, Holt M, Stenius K et al., 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*. 127:831-46.

Takei K, Mundigl O, Daniell L et al., 1996. The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol* . 133:1237-1250.

Tamir H, Piscopo I, Liu KP et al., 1994. Secretagogue induced gating of chloride channels in the secretory vesicles of parafollicular cells. *Endocrinology*. 135:2045-2057.

Teng H, Cole JC, Roberts RL et al., 1999. Endocytic active zones: Hot spots for endocytosis in vertebrate neuromuscular terminals. *J Neurosci*. 19:4855-4866

Turner KM, Burgoyne RD, Morgan A, 1999. Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. *Trends Neurosci*. 22:459-64.

Valtorta F, Meldolesi J, Fesce R, 2001. Synaptic vesicles: is kissing a matter of competence? *Trends Cell Biol*. 11:324-8.

Van der Kloot W, 1987. Inhibition of packing of acetylcholine into quanta by ammonium. *FASEB J.* 1:298-302.

Van der Kloot W, Colasante C, Cameron R et al., 2000. Recycling and refilling of transmitter quanta at the frog neuromuscular junction. *J Physiol.* 523 Pt 1:247-58.

Van der Kloot W, 2003. A chloride channel blocker reduces acetylcholine uptake into synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *Brain Res.* 961:287-9.

von Gersdorff H & Matthews G, 1994. Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature.* 367:735-739

von Gersdorff H, Vardi E, Matthews G et al., 1996. Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron.* 16:1221-1227.

von Gersdorff H, Sakaba T, Berglund K et al., 1998. Submillisecond kinetics of glutamate release from a sensory synapse. *Neuron.* 21:1177-88.

Wang LY, Salter MW, MacDonald JF, 1991. Regulation of kainate receptors by cAMP-dependent protein kinase and phosphatases. *Science.* 253:1132-5.

Wassle H, 2004. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci.* 5:747-57.

Weber T, Zemelman BV, McNew JA et al., 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell.* 6:759-72.

Weisskopf MG, Castillo PE, Zalutsky RA. Et al., 1994. Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science.* 265:1878-82.

Witkovsky P & Dowling JE, 1969. Synaptic relationships in the plexiform layers of carp retina. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 100:60-82.

Wojcik SM, Rhee JS, Herzog E et al., 2004. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101:7158–7163.

Wolosker H, de Souza DO, de Meis L, 1996. Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride and proton gradient. *J Biol Chem.* 271:11726-11731.

Yang XL, 2004. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog. Neurobiol.* 73:127-150.

Zenisek D, Horst NK, Merrifield C et al., 2004. Visualizing synaptic ribbons in the living cell. *J Neurosci.* 24:9752–9759.

Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C et al., 2001. Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron.* 29:131-43.

Zhou Q, Petersen CC, Nicoll RA, 2000. Effects of reduced vesicular filling on synaptic transmission in rat hippocampal neurons. *J Physiol.* 525:195-206.

Zucker RS, 1996. Exocytosis: A molecular and physiological perspective. *Neuron* 6:1049-55.

IX. Anexos

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)