

Ernani Aloysio Amaral

**Inibição da Na⁺/K⁺ATPase pelo Derivado Esteróide
Ouabaína: Implicações sobre o Ciclo de Vesículas
Sinápticas em Junção Neuromuscular**

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, julho de 2006.

Ernani Aloysio Amaral

**Inibição da Na^+/K^+ ATPase pelo Derivado Esteróide
Ouabaína: Implicações sobre o Ciclo de Vesículas
Sinápticas em Junção Neuromuscular**

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

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

Belo Horizonte, julho de 2006.

Apoio Institucional

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

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

Aos meus pais, José Geraldo e Cecília, à minha irmã Josane,
à tia Dalva, a Daila,
com muito carinho!

Agradecimentos

Agradeço a Deus por iluminar a minha vida e a minha trajetória de estudante.

Manifesto ainda a minha gratidão aos meus familiares e amigos de Berilo pela força e torcida.

Aos meus amigos do laboratório de Biologia da Neurotransmissão: Débora, Renan, Livia, Célio, Maíla, Stefânia, Bento João e, especialmente, a Luciana pela importante contribuição.

A Janice pelo estímulo e amizade.

Aos colegas do laboratório de Neurofarmacologia e do Curso de Pós-graduação em Biologia Celular.

Ao Professor Marco Antônio Prado pelas oportunidades e colaboração.

Às professoras Lucília Teixeira e Vânia Bicalho, o meu reconhecimento.

Agradeço, de modo especial, à Professora Cristina Guatimosim pelos ensinamentos, dedicação e incentivo.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	10
ABSTRACT.....	11
RESUMO.....	12
1 - INTRODUÇÃO.....	13
1.1 – Morfologia da junção neuromuscular	13
1.2 – Ciclo sináptico na junção neuromuscular.....	16
1.3 – Monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas utilizando o marcador fluorescente FM1-43.....	21
1.4 – Influência da ouabaína sobre o ciclo de vesículas sinápticas.....	24
2 – OBJETIVOS.....	27
2.1 – Objetivo geral.....	27
2.2 – Objetivos específicos.....	27
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 – Marcação de vesículas sinápticas com FM1-43 e obtenção de imagens.....	28
3.2 – Registro dos efeitos da ouabaína sobre liberação vesicular.....	29
3.3 – Análise do papel do Na ⁺ e do Ca ²⁺ extracelular.....	29

3.4 – Análise dos efeitos da ouabaína sobre a endocitose.....	29
4 – RESULTADOS.....	31
4.1 – Marcação dos aglomerados vesiculares com FM1-43.....	31
4.2 – Ouabaína induz liberação vesicular.....	32
4.3 – Liberação vesicular evocada pela ouabaína depende da presença de íons Na ⁺ no meio extracelular.....	34
4.4 – Liberação vesicular evocada pela ouabaína independe da presença de íons Ca ²⁺ no meio extracelular.....	37
4.5 – Ouabaína inibe endocitose.....	40
5 – DISCUSSÃO.....	43
5.1 – Marcação de vesículas sinápticas com FM1-43.....	43
5.2 – Ouabaína e liberação vesicular.....	44
5.3 – Papel dos íons Na ⁺ e Ca ²⁺ na exocitose evocada pela ouabaína.....	45
5.4 – Ouabaína e inibição da endocitose.....	49
6 – CONCLUSÃO.....	52
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

Lista de Abreviaturas

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AChE	Acetilcolinesterase
BAPTA-AM	(bis-(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácidotetracético
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Ca ²⁺	Íon cálcio
CCCP	Carbonil cianeto <i>m</i> -clorofenildrazona
CCD	<i>Charge- coupled device</i>
ChAT	Colina acetiltransferase
ChCl ₂	Cloreto de Colina
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
EGTA	Etilenoglicol-bis-β-aminoetil éster
FM1-43	N-(3- <i>triethylammonium-propyl</i>)-4-(4(<i>dibutylamino</i>)- <i>styryl</i>)pyridinium dibromide
H ⁺	Íons hidrogênio
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazida-N'-2-etanosulfônico
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hz	<i>Hertz</i>
K ⁺	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
Li ⁺	Íon lítio
LiCl	Cloreto de lítio
MEPPs	<i>Miniature end plate potentials</i>
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
Mg ²⁺	Íon magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ms	Milisegundo
N	Normal
Na ⁺	Íon sódio

NaCl	Cloreto de sódio
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Bomba de sódio/potássio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>
TMB-8	8-(dietilamino)octil-3,4,5-trimetoxibenzoato
T-SNARE	<i>Target SNARE</i>
V	Volt
VACht	Transportador vesicular da acetilcolina
VH ⁺ -ATPase	Bomba vesicular de íons hidrogênio
V-SNARE	<i>Vesicular SNARE</i>

Lista de Figuras

Figura 1 – Junção neuromuscular de rã.....	15
Figura 2 – Etapas básicas da neurotransmissão.....	19
Figura 3 – Modelos de endocitose de vesículas sinápticas em junção neuromuscular.....	20
Figura 4 – O marcador fluorescente FM1-43 é utilizado para o monitoramento dos passos de endocitose e exocitose de vesículas sinápticas em neurônios.....	23
Figura 5 – Ouabaína promove liberação vesicular com conseqüente desmarcação de terminais axonais contendo FM1-43.....	33
Figura 6 – Liberação vesicular evocada pela ouabaína depende da presença de íons sódio no meio extracelular.....	35
Figura 7 – Dependência de íons sódio no meio extracelular para liberação vesicular evocada pela ouabaína.....	36
Figura 8 – Liberação vesicular evocada pela ouabaína independe da presença de íons cálcio no meio extracelular.....	39
Figura 9 – BAPTA-AM interfere com o sinal fluorescente emitido pelo FM1-43.....	39
Figura 10 – Inibição da endocitose pela ouabaína.....	42
Figura 11 – Inibição da endocitose pela ouabaína não se deve à acidificação do terminal pré-sináptico.....	42

Abstract

Ouabain is a cardiotonic steroid derivative and a specific inhibitor of the Na⁺K⁺-ATPase. In this work, the effects of ouabain on the synaptic vesicle cycle at the frog neuromuscular junction were investigated using the fluorescent probe FM1-43. This dye is an amphiphilic molecule with a hydrophobic tail that promotes the binding of the probe to the nerve terminal membrane. Upon a depolarizing stimulus, membrane with FM1-43 is taken up during compensatory endocytosis and the recycled vesicular *pools* can be visualized by means of fluorescence microscopy like fluorescent spots. By further stimulation in the absence of the dye, it is possible to follow and measure the exocytosis. Ouabain was then utilized to investigate the effects of the glycoside on FM1-43 uptake and release during synaptic vesicle cycle. Ouabain caused a dose-dependent decrease of the fluorescent spots intensity. This effect was Na⁺ dependent but independent of the extracellular Ca²⁺. Simultaneous application of ouabain and FM1-43 did not result in appreciable staining of the motor terminals. Pre-incubation with ouabain before electric stimulation inhibited FM1-43 uptake, even after a prolonged washing time. The addition of NH₄Cl, that buffers H⁺ ions, did not reverse the ouabain effects on FM1-43 uptake. The results show that ouabain evokes synaptic vesicle exocytosis and inhibits endocytosis. The endocytosis inhibition by the glycoside is not caused by acidification of the pre-synaptic terminal. The ouabain evoked exocytosis is dependent on the sodium levels in the medium but independent of external calcium suggesting that the vesicular release induced by ouabain is possibly mediated by mobilization of intracellular calcium stores. These results may, in the future, guide cellular and molecular studies that respond how the ionic changes induced by ouabain interfere with the proteic machinery that controls the synaptic vesicle traffic.

Resumo

Ouabaína é um derivado esteróide cardiotônico e inibidor específico da Na^+K^+ -ATPase. Neste trabalho, os efeitos da ouabaína sobre o ciclo de vesículas sinápticas na junção neuromuscular de rã foram investigados de forma direta e dinâmica utilizando-se a sonda fluorescente FM1-43. Este marcador consiste em uma molécula anfipática com uma cauda hidrofóbica que promove a ligação da sonda à membrana do terminal axonal. Após um estímulo despolarizante, a membrana marcada com FM1-43 é internalizada por endocitose compensatória de modo que os aglomerados vesiculares podem ser visualizados por meio de microscopia de fluorescência sob a forma de pontos fluorescentes. Estimulação adicional na ausência de FM1-43 permite acompanhar e mensurar a exocitose. Assim, a ouabaína foi utilizada para investigação dos efeitos do glicosídeo sobre a captação e liberação de FM1-43 durante o ciclo de vesículas sinápticas. Ouabaína levou a uma redução dose-dependente da fluorescência dos aglomerados vesiculares contendo FM1-43. Este efeito mostrou-se dependente da presença de Na^+ no meio, mas independente do Ca^{2+} extracelular. Aplicação simultânea de ouabaína e FM1-43 não resultou em marcação apreciável de terminais motores. Pré-incubação com ouabaína, antes da estimulação elétrica, inibiu a captação de FM1-43, mesmo após lavagem prolongada da preparação. Os resultados obtidos indicam que a ouabaína promove liberação vesicular, mas inibe endocitose. Aplicação de NH_4Cl , substância que faz o tamponamento de íons H^+ , não reverteu os efeitos da ouabaína sobre a captação de FM1-43 sugerindo que a inibição da endocitose não se deve a um efeito de acidificação do terminal pré-sináptico. A exocitose evocada pela ouabaína é dependente dos níveis de sódio no meio, mas independente da presença de cálcio extracelular, sugerindo que a liberação vesicular induzida pela ouabaína seja possivelmente mediada pelo recrutamento de estoques intracelulares de cálcio. Os achados apresentados neste trabalho podem futuramente nortear abordagens celulares e moleculares que esclareçam como as alterações iônicas desencadeadas pela ouabaína interferem com a maquinaria protéica que regula o tráfego de vesículas sinápticas.

1 – Introdução

1.1 – Morfologia da Junção Neuromuscular

As sinapses são áreas especializadas de contato celular onde sinais são precisamente transferidos de um neurônio para uma célula alvo. Em sinapses químicas, um sinal elétrico resultante da propagação de correntes iônicas é convertido em um sinal químico, representado pela liberação de neurotransmissores que irão atuar sobre a célula alvo (revisado por Zhai & Bellen, 2004).

A junção neuromuscular é uma sinapse química colinérgica cuja função é transferir impulsos de uma terminação motora relativamente pequena para uma fibra muscular ampla e, assim, desencadear contração (figura 1A). Portanto, ela funciona como um relé (Katz, 1966).

Em músculo esquelético de rã, o axônio motor dá origem em sua porção distal a um conjunto de ramos terminais não mielinizados de 1,5 μm de diâmetro que percorrem sulcos rasos na superfície da fibra muscular por extensões de aproximadamente 100 μm (figura 1A) (Katz, 1966). Ao longo de todo o curso do terminal, é possível observar, no plano ultraestrutural, regiões eletrondensas que marcam os sítios subcelulares da transmissão sináptica, as zonas ativas. Cada zona ativa pode ser identificada pela sua associação com aglomerados de vesículas sinápticas pequenas de aproximadamente 50nm de diâmetro que encerram acetilcolina em seu interior. Em adição às vesículas sinápticas pequenas, o terminal pré-sináptico apresenta também vesículas de conteúdo denso que armazenam peptídeos relacionados com a modulação da transmissão, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (figura 1B) (revisado por Hall & Sanes, 1993 e Burns & Augustine, 1995).

Compondo o aparato pré-sináptico estão presentes também canais de cálcio sensíveis à voltagem, dispostos em fileiras e intimamente associados à zona ativa, bem próximos aos aglomerados vesiculares. Esta disposição singular garante um rápido pico na concentração intracelular de cálcio nos sítios de exocitose durante o disparo da liberação vesicular, conferindo sincronia ao processo (Robitaille *et al.*, 1990; revisado por Zhai & Bellen, 2004).

O elemento pós-sináptico, separado da membrana pré-sináptica por um espaço de aproximadamente 50nm de largura chamado de fenda sináptica, apresenta um grande número de receptores nicotínicos da acetilcolina. Esses receptores não estão uniformemente distribuídos pelo aparato pós-sináptico, mas sim formando agrupamentos nas dobras da membrana pós-sináptica, atingindo nesses locais densidades que podem chegar a mais de 10000 por mm^2 (Figura 1B). Esse arranjo permite aos receptores detectar de forma rápida e eficiente a acetilcolina liberada durante a excitação (revisado por Hall, 1992 e Hall & Sanes, 1993). Portanto, a estrutura da junção neuromuscular garante uma excelente integração entre o sistema nervoso e as células musculares, constituindo também o principal modelo experimental para estudo das funções sinápticas em virtude de sua simplicidade morfológica, de suas dimensões amplas e de sua acessibilidade quando comparada, por exemplo, com uma sinapse entre neurônios no sistema nervoso central (revisado por Sanes & Lichtman, 2001).

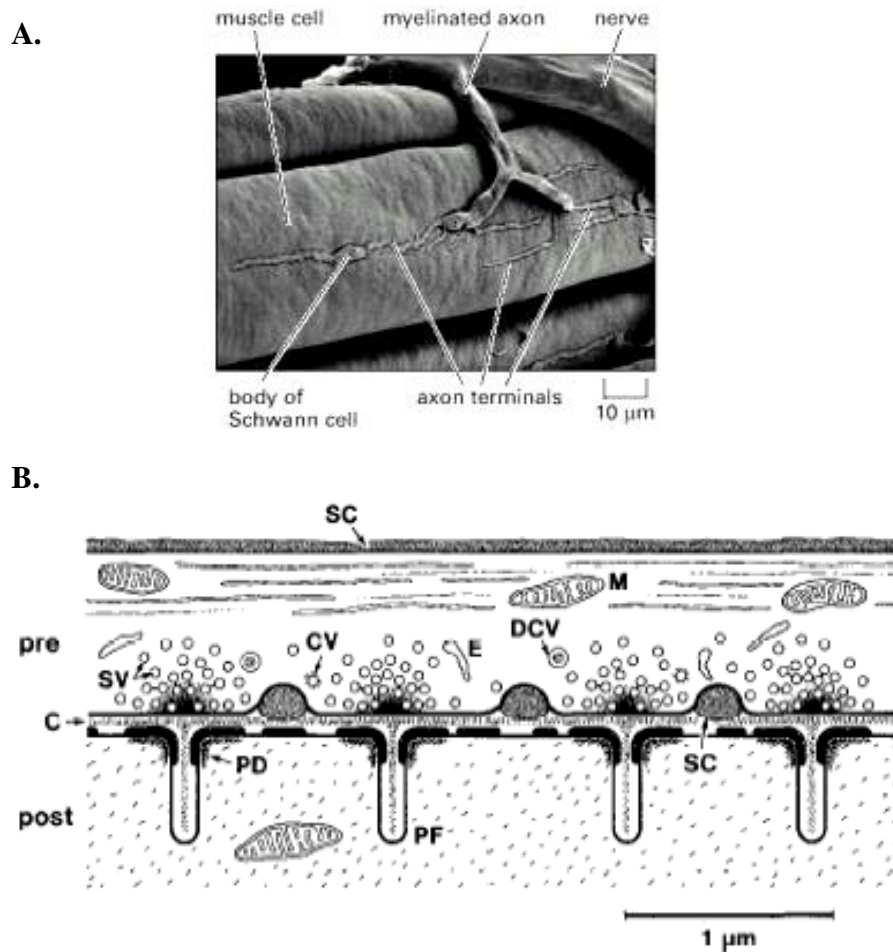


Figura 1: Junção Neuromuscular de rã. **(A)** Micrografia eletrônica de varredura de junção neuromuscular de rã. É possível observar terminais axonais dispostos longitudinalmente ao longo de uma célula muscular estriada esquelética. Ao longo dos terminais axonais existem áreas de contato sináptico como evidenciado em “B” (Desaki & Uehara, 1981). **(B)** Estrutura esquemática de junção neuromuscular de rã. O componente pré-sináptico inclui as zonas ativas associadas a vesículas sinápticas pequenas (SV), vesículas de conteúdo denso (DCV) e numerosas organelas como vesículas cobertas por clatrina (CV), endossomos (E) e mitocôndrias (M). O componente pré-sináptico é envolvido por uma Célula de Schwann (SC). O elemento pós-sináptico apresenta dobras pós-juncionais (PF), espessadas em seu ápice em virtude da alta densidade de receptores de acetilcolina na densidade pós-sináptica (PD). Os elementos pré e pós-sinápticos são separados por uma estreita fenda sináptica (C) (Burns & Augustine, 1995).

1.2 - Ciclo sináptico na junção neuromuscular

De maneira geral, a transmissão sináptica envolve a fusão de vesículas contendo neurotransmissores com a membrana plasmática e ativação de receptores pós-sinápticos (figura 2). Os neurotransmissores clássicos são sintetizados na própria terminação axonal, são armazenados no interior de vesículas e liberados na fenda sináptica, próximo aos seus receptores, através de áreas especializadas do terminal, as zonas ativas. É a passagem de um potencial de ação, desencadeando a abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem e o influxo desse íon para o citoplasma do terminal axonal, que promove o disparo da liberação de neurotransmissores (revisado por Katz, 1966 e Murthy & De Camilli, 2003).

Na junção neuromuscular, a acetilcolina é sintetizada no terminal pré-sináptico pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) a partir da colina e do acetil-CoA. Após sua síntese, a acetilcolina é armazenada no interior das vesículas graças a seu transportador vesicular, VACHT, uma proteína com 12 domínios transmembrana. O VACHT aproveita-se de um gradiente eletroquímico gerado por bombas de prótons presentes na membrana vesicular, as VH^+ -ATPases (Nguyen *et al.*, 1998; revisado por Prado *et al.*, 2002 e Bravo & Parsons, 2002). Essas VH^+ -ATPases, por meio da hidrólise do ATP, translocam prótons H^+ para o interior das vesículas sinápticas, estabelecendo duas condições: primeira, o pH no interior da vesícula torna-se mais ácido, gerando um gradiente químico de pH (ΔpH) através da membrana vesicular; segunda, o interior da vesícula torna-se abundante em cargas positivas, criando um potencial elétrico transmembrana ($\Delta \Psi$). O somatório dessas duas condições corresponde ao gradiente eletroquímico, representado pela equação $\Delta \mu H^+ = \Delta pH + \Delta \Psi$ (revisado por Ozkan & Ueda, 1997). O VACHT realiza, então, a troca de dois íons H^+ por uma molécula de acetilcolina, preenchendo o interior das vesículas com o neurotransmissor (revisado por Prado *et al.*, 2002).

O bombeamento de H^+ pelas VH^+ -ATPases promove um acúmulo de cargas positivas no interior das vesículas sinápticas. Contudo, existem evidências de que canais de cloreto possibilitam a entrada de íons Cl^- que neutralizam o excesso de cargas positivas, reduzindo assim a influência do componente elétrico $\Delta \Psi$ na captação de acetilcolina, mantida essencialmente pelo componente químico ΔpH do gradiente $\Delta \mu H^+ = \Delta pH + \Delta \Psi$ (Strobawa *et al.*, 2001; van der Kloot, 2003).

Após a exocitose e ativação dos receptores nicotínicos, a acetilcolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda sináptica, gerando colina e acetato. A colina é recaptada para o interior do terminal por meio de seu transportador de membrana de alta afinidade (CHT1) e será novamente utilizada para a síntese de nova acetilcolina (revisado por Ribeiro *et al.*, 2006).

Cada vesícula sináptica presente na junção neuromuscular se enquadra em um de três conjuntos possíveis: o *pool* de vesículas prontamente liberáveis, o *pool* de reciclagem ou o *pool* de reserva. O *pool* de vesículas prontamente liberáveis está imediatamente disponível para exocitose durante estimulação e, geralmente, suas vesículas estão ancoradas na zona ativa, aptas para a liberação. Por sua vez, o *pool* de reciclagem é definido como o conjunto de vesículas que mantém a liberação de neurotransmissores em estimulação - fisiológica - moderada. Por último, o *pool* de reserva consiste em um depósito de vesículas sinápticas cuja liberação ocorre durante intensa estimulação (revisado por Rizzoli & Betz, 2005).

Durante a neurotransmissão, as vesículas sinápticas, organizadas em *pools* vesiculares, passam por um ciclo nos terminais nervosos, podendo ser dividido em passos seqüenciais (figura 2): inicialmente os neurotransmissores são transportados para o interior das vesículas sinápticas, as quais se agrupam nas adjacências da zona ativa, onde irão ancorar-se e tornar-se-ão competentes para a fusão e liberação de seu conteúdo na fenda sináptica (revisado por Sudhof, 2004). Após a exocitose de seu conteúdo, as vesículas sinápticas sofrem endocitose e reciclagem por uma de três vias alternativas (figura 3): (a) endocitose mediada por capa de clatrina (Heuse & Reese, 1973; Richards *et al.*, 2000); (b) endocitose por meio de amplas invaginações de membrana e formação de cisternas (Takei *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 2000; Richards *et al.*, 2003); (c) endocitose designada como *Kiss and Run* na qual vesículas liberam seu conteúdo sem se integrarem completamente à membrana pré-sináptica, sendo reacidificadas e novamente preenchidas por neurotransmissores (Ceccarelli, *et al.*, 1973; Pyle *et al.*, 2000; Gandhi & Stevens, 2003).

É importante destacar que uma série de interações moleculares está envolvida com o controle do ciclo sináptico. Nesse amplo conjunto molecular coordenador do ciclo sináptico, é bem definido o papel do complexo SNARE e da sinaptotagmina I. Esta é uma proteína integral de vesículas sinápticas relacionada funcionalmente ao disparo da exocitose

mediante interação com íons cálcio. A sinaptotagmina também mantém interações com lípidos de membrana e elementos do complexo SNARE que, por sua vez, é constituído pela syntaxina, SNAP-25 e a sinaptobrevina. A syntaxina e a SNAP-25 estão presentes na membrana pré-sináptica e, por isso, são designadas como t-SNAREs (*target SNAREs*). Já a sinaptobrevina situa-se na membrana das vesículas, sendo então designada como v-SNARE (*vesicular SNARE*). Essas três proteínas regem, por meio do seu entrelaçamento e estabelecimento de um complexo heterotrimérico, o ancoramento e fusão vesicular com a membrana pré-sináptica, possibilitando a liberação regulada de neurotransmissor (figura 2) (revisado por Murthy & De Camilli, 2003 e Sudhof, 2004).

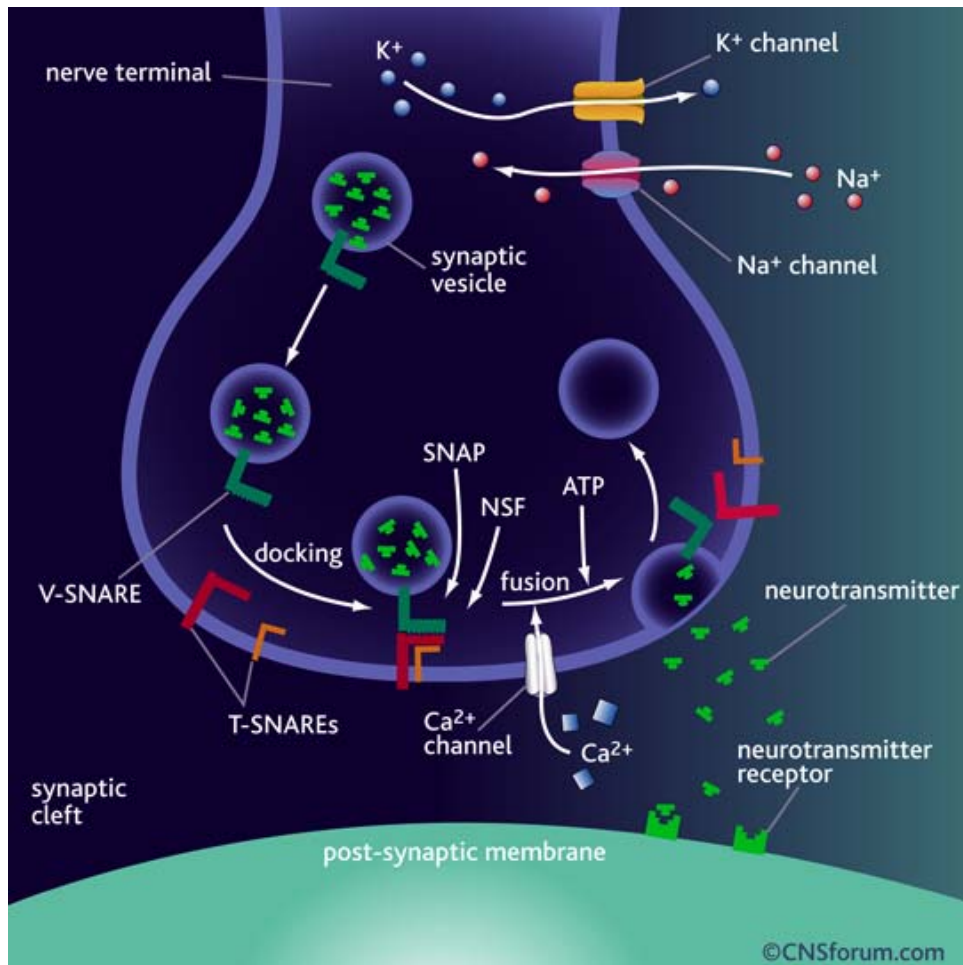


Figura 2: Etapas básicas da neurotransmissão. Durante a despolarização, após a abertura de canais de sódio sensíveis à voltagem, íons cálcio penetram no terminal pré-sináptico via canais de cálcio sensíveis à voltagem, levando a um aumento da concentração intraterminal desse cátion. Vesículas sinápticas contendo neurotransmissores se acumulam nas adjacências das zonas ativas, sítios subcelulares da liberação vesicular. As vesículas que se ancoram na zona ativa (docking) sofrem uma reação de amadurecimento (priming) que as tornam competentes para a abertura de um poro de fusão (fusion) e exocitose dos neurotransmissores. Observe formação de complexo heterotrimérico entre *t-SNAREs* e *v-SNARE*. Após exocitose, os *pools* vesiculares são reconstituídos por meio de endocitose compensatória (www.cnsforum.com/hirespng/vesicle-fusion.png).

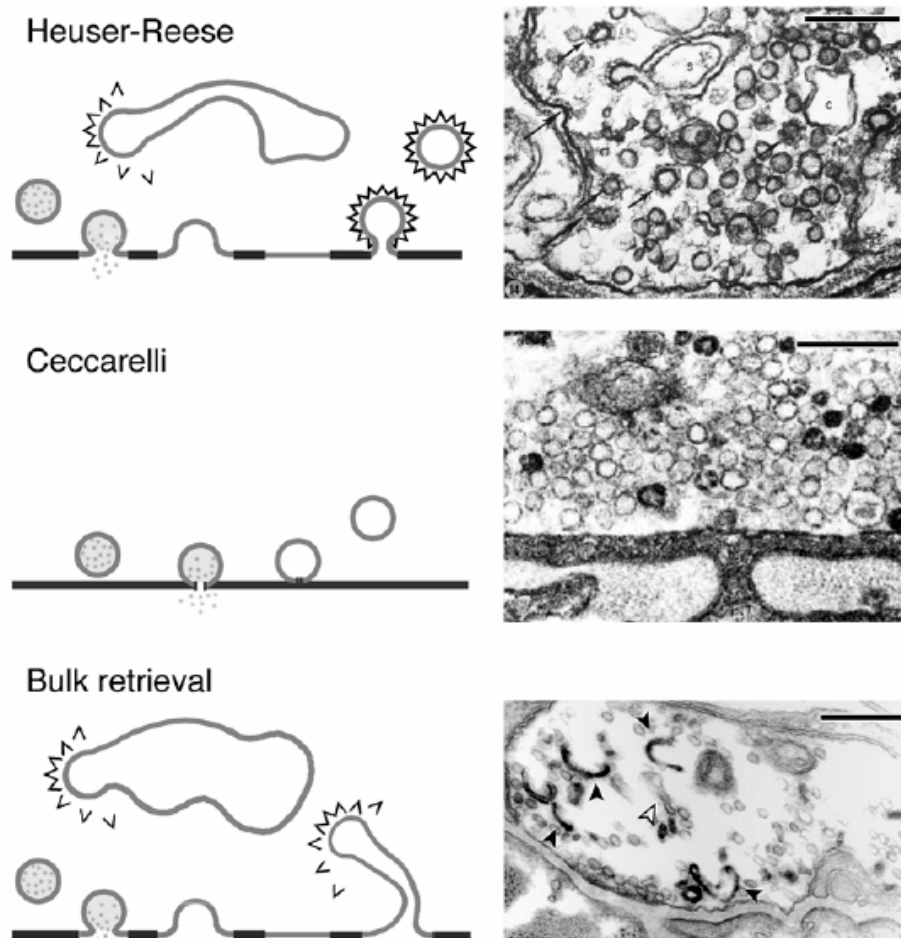


Figura 3: Modelos de endocitose de vesículas sinápticas em junção neuromuscular. **(Painel Superior)** Modelo de Heuser & Reese no qual as vesículas sinápticas são completamente integradas à membrana da zona ativa durante a excitose e são recicladas por meio de endocitose mediada por capa de clatrina. Vesículas cobertas podem também brotar a partir de grandes cisternas (diagrama à esquerda). Micrografia eletrônica (à direita) demonstrando a presença de depressões de membrana e vesículas cobertas por capa de clatrina (setas) em terminal motor submetido a estímulo elétrico. É possível observar também a presença de cisternas (c). **(Painel médio)** Diagrama representando modelo de *kiss and run* (à esquerda) proposto por Ceccarelli no qual, durante a liberação de neurotransmissores, as vesículas abrem um poro de fusão transitório, mas não se fundem completamente a membrana pré-sináptica, sendo recicladas localmente. Micrografia eletrônica (à direita) de terminal motor submetido a estímulo elétrico de baixa frequência por duas horas. Destaca-se a ausência de vesículas cobertas por capa de clatrina e de cisternas. **(Painel inferior)** Diagrama representando endocitose via grandes invaginações de membrana (à esquerda) após liberação vesicular. Micrografia eletrônica (à direita) indicando invaginações de membrana contendo FM1-43 fotoconvertido (setas negras) ou desprovidas do marcador (seta clara) (revisado por Royle & Lagnado, 2003).

1.3 – Monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas utilizando o marcador fluorescente 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 vesículas sinápticas, tornou-se muito divulgado o uso de marcadores do tipo “FM”. Marcadores do tipo FM, como o FM1-43, são moléculas anfipáticas nas quais uma cauda lipofílica está ligada a uma cabeça carregada positivamente via ligações duplas (figura 4A). A cabeça carregada positivamente impede o marcador de atravessar livremente as membranas celulares, mantendo-o preso no interior de endossomas ou vesículas. 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 (figura 4B). Quando a preparação é lavada em meio desprovido de FM, as moléculas do marcador são removidas da superfície celular (figura 4C). (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 (figura 4B). Além disso, as moléculas de FM estão permanentemente carregadas (cabeça com valência +2), impedindo que elas se difundam 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 fusão e incorporação da membrana das vesículas à membrana da zona ativa durante a exocitose, a endocitose compensatória promoverá reciclagem dos *pools* vesiculares com membrana marcada com FM de modo que as vesículas recicladas apresentarão o marcador aprisionado em seu interior e aderido a sua membrana (figura 4B). Isto possibilitará a visualização de aglomerados vesiculares marcados com a sonda em microscópio de fluorescência sob a forma de pontos fluorescentes (figura 5A). O excesso de FM ligado à membrana das células musculares ou à mielina dos nervos será removido durante lavagem da preparação em meio desprovido do marcador (figura 4C). Caso a preparação seja estimulada por algum agente que desencadeie exocitose, como estímulo elétrico, ocorrerá uma nova etapa de liberação de neurotransmissores e exposição da sonda ao meio aquoso, possibilitando difusão do FM1-43 para a solução salina na qual se encontra a preparação (figura 4D). Isso determinará redução do sinal fluorescente e desmarcação dos pontos que representavam os aglomerados vesiculares que continham o marcador (figura 4E).

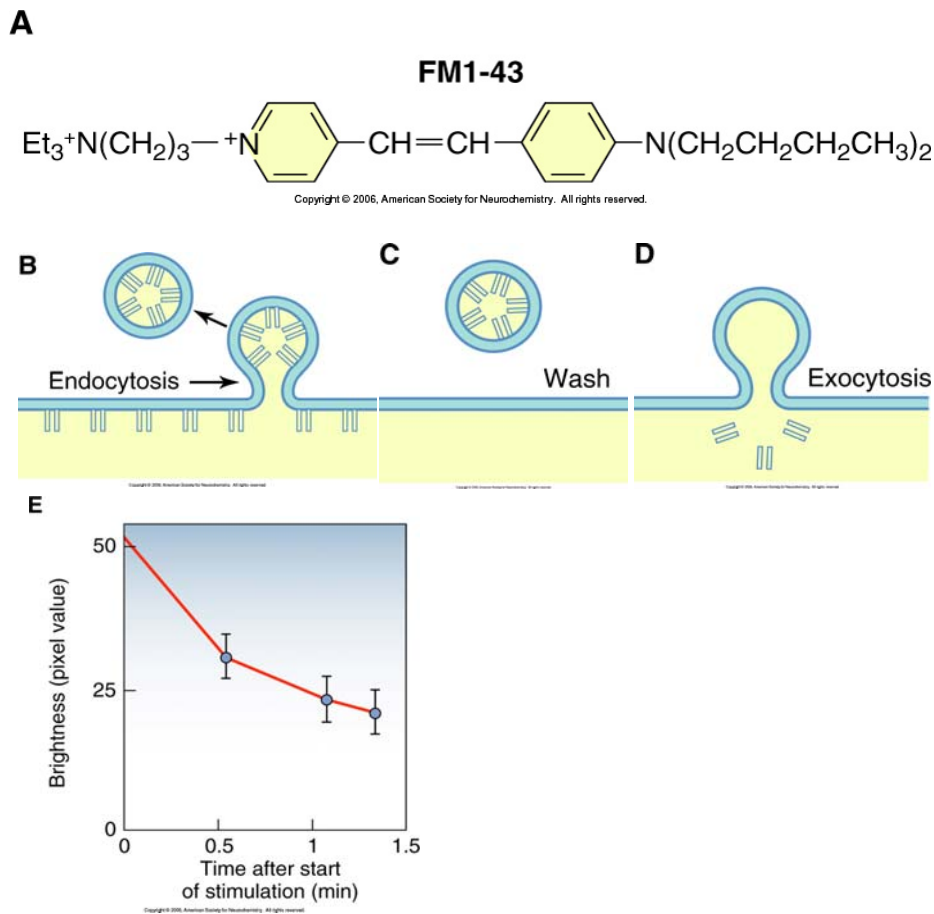


Figura 4: O marcador fluorescente FM1-43 é utilizado para monitoramento dos passos de endocitose e exocitose de vesículas sinápticas em neurônios. **(A)** Estrutura da sonda fluorescente FM1-43. **(B)** Marcação da membrana do terminal pré-sináptico com o FM1-43 adicionado à solução salina. O neurônio foi estimulado eletricamente na presença de FM1-43. Notar que a membrana que originou uma nova vesícula sináptica está marcada com a sonda. **(C)** Uma breve lavagem remove as moléculas de FM que não foram internalizadas. **(D)** Um segundo ciclo de exocitose induzido por estímulo elétrico resulta na liberação da sonda que foi internalizada durante a endocitose. **(E)** Declínio da fluorescência da sonda FM1-43 durante exocitose de vesículas induzida por estímulo elétrico. Essa perda de fluorescência resulta da passagem da sonda de um meio hidrofóbico (membrana da vesícula sináptica) para um meio aquoso (solução salina) durante a exocitose (*Basic Neurochemistry, seventh edition. Edited by Siegel et. al., 2006*).

1.4 – Influência da Ouabaína sobre o ciclo de vesículas sinápticas

A Ouabaína é um potente derivado esteróide, cardiotônico, obtido a partir de sementes maduras de *Strophantus gratus* e *Acokanthera ouabaio*, plantas de origem africana. Contudo, trabalhos recentes indicam possível síntese endógena e também apontam a existência de esteróides semelhantes à ouabaína em tecidos de mamíferos. Em 1991, um isômero da ouabaína foi identificado como um hormônio endógeno sintetizado pela glândula adrenal e também pelo hipotálamo, contudo o seu mecanismo de ação e sua significância fisiológica não foram ainda precisamente determinados (Hamlyn *et al.*, 1991 & 2003; Boulanger *et al.*, 1993; Scheneider *et al.*, 1998; Kawamura *et al.*, 2001).

O glicosídeo ouabaína é usado freqüentemente em pesquisas biomédicas como inibidor específico da Na^+, K^+ -ATPase da membrana plasmática, proteína que cataliza o transporte ativo acoplado de Na^+ e K^+ , estabelecendo um gradiente eletroquímico através da membrana plasmática. Portanto, diferentemente de outros esteróides, a ouabaína liga-se a uma proteína de membrana. Considerando que a Na^+, K^+ -ATPase é o principal sistema de transporte ativo na maioria das células animais, promovendo a extrusão de três íons Na^+ e a entrada de dois íons K^+ , sua inibição gera uma condição que favorece o acúmulo intracelular de Na^+ (Birks & Cohen, 1968; Gomez *et al.*, 1975; Aizman *et al.*, 2001; McFadden *et al.*, 2001).

Birks (1962) demonstrou que preparações de gânglio simpático de gato e junções neuromusculares de rã submetidas a tratamento com digoxina, um glicosídeo cardíaco assim como a ouabaína, apresentavam importantes modificações estruturais ao microscópio eletrônico de transmissão. No gânglio, as células neuronais apresentavam-se dilatadas, ocorria uma redução das dimensões mitocondriais com pronunciado aumento da eletron densidade dessas organelas. Era possível também observar um aumento de volume da substância de *Nissl* e que o citoplasma tinha aspecto mais claro do que em células não tratadas. Os terminais axonais também se apresentavam dilatados, possuíam mitocôndrias com estrutura alterada e as vesículas sinápticas eram praticamente ausentes. Algo semelhante era observado com as junções neuromusculares tratadas com digoxina. Em ambos os modelos experimentais, a redução dos níveis de sódio extracelular inibia o aparecimento das alterações morfológicas descritas.

Vários trabalhos demonstraram que a ouabaína induz uma liberação ampla de neurotransmissores. Experimentos realizados com fatias corticais de cérebro de rato indicaram que a Ouabaína promove liberação de acetilcolina marcada radioativamente, independentemente da presença de Ca^{2+} no meio extracelular e da ativação de canais de Na^+ e Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Vizi, 1972; Gomez *et al.*, 1975; Casali, *et al.*, 1995). Contudo, a liberação de neurotransmissores induzida pelo glicosídeo mostrou-se dependente da presença de Na^+ no meio extracelular e mediada pelo recrutamento de estoques intracelulares de Ca^{2+} (Lomeo *et al.*, 2003). Apesar das evidências indicando que a liberação de neurotransmissores evocada pela ouabaína tenha precisa relação com os níveis de sódio e determine recrutamento de estoques intracelulares de cálcio, sinaptosomas obtidos de córtex cerebral de cobaias, submetidos a tratamento com ouabaína na ausência de cálcio extracelular, apresentaram o mesmo potencial de liberação de acetilcolina- C^{14} independentemente da presença ou não de BAPTA-AM, um quelante intracelular de cálcio (Adam-Vizi *et al.*, 1993). Além disso, em preparações utilizando gânglio simpático de gato, a liberação de neurotransmissor evocada pela ouabaína mostrou-se dependente do cálcio extracelular (Prado *et al.*, 1993).

Em junção neuromuscular de rã, análises eletrofisiológicas demonstraram que a ouabaína determina aumento da amplitude de potenciais pós-sinápticos evocados (EPPs) e aumento da frequência de potenciais pós-sinápticos em miniatura (MEPPs). Por sua vez, análise ultra-estrutural das junções neuromusculares após incubação com ouabaína evidenciou depleção dos *pools* de vesículas sinápticas, comprometimento da endocitose e dilatação mitocondrial (Birks & Cohen, 1968; Baker & Crawford, 1974; Haimann *et al.*, 1985).

Tendo em vista as alterações eletrofisiológicas e morfológicas induzidas pela ouabaína em diversos modelos experimentais, este trabalho descreve pela primeira vez o uso da sonda fluorescente FM1-43 no monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas em junção neuromuscular de rã submetidas ao tratamento com ouabaína. Essa nova abordagem permite estudar os efeitos do glicosídeo sobre exocitose e endocitose em material não fixado, através de preparações *extra-vivo*, com obtenção de imagens que registram em tempo real as alterações induzidas pelo derivado esteróide. Os resultados obtidos com esta investigação dinâmica do ciclo sináptico poderão nortear abordagens celulares e

moleculares que esclareçam como as alterações iônicas desencadeadas pela ouabaina interferem com a maquinaria protéica que regula os passos de exocitose e endocitose de vesículas sinápticas e, no futuro, subsidiar meios para intervenção farmacológica em disfunções da transmissão sináptica central e periférica. Desta forma, os achados apresentados neste trabalho contribuem para melhor compreensão do sistema colinérgico e neurotransmissão em geral.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

Investigar os efeitos do derivado esteróide ouabaína sobre o ciclo de vesículas sinápticas em junção neuromuscular de rã utilizando o marcador fluorescente FM1-43.

2.2 - Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos da ouabaína sobre os *pools* de vesículas sinápticas marcadas com FM1-43.

- Analisar a participação dos íons Na^+ e Ca^{2+} extracelular nos efeitos da ouabaína sobre os *pools* de vesículas marcadas com FM1-43.

- Investigar as implicações da administração de ouabaína sobre a endocitose compensatória em junção neuromuscular.

- Observar a reversibilidade e/ou irreversibilidade dos efeitos da ouabaína sobre o ciclo sináptico em junção neuromuscular de rã;

3 - Materiais e Métodos

3.1 – Marcação de vesículas sinápticas com FM1-43 e obtenção de imagens

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

Para marcação das vesículas sinápticas, utilizou-se o marcador fluorescente FM1-43 (Molecular Probes™) em adição à solução salina, obtendo-se uma concentração de 4µM. O nervo era apreendido por um eletrodo de sucção acoplado a um estimulador elétrico que liberava pulsos de 20Hz, 0,5ms de duração e 4V de amplitude durante 10 minutos. Após a estimulação, mantinha-se a preparação em repouso por 15 minutos em meio contendo FM1-43 para garantir captação do marcador durante endocitose compensatória. Em seguida, lavava-se a preparação em solução salina desprovida de FM no mínimo por uma hora para que o excesso de marcador associado à membrana das fibras musculares fosse removido, permitindo melhor visualização dos agrupamentos vesiculares contendo FM1-43 ao longo das terminações axonais.

As imagens dos terminais nervosos marcados com FM1-43 eram obtidas com um microscópio de fluorescência (Zeiss Axioskop®) acoplado a uma câmera de CCD Micromax refrigerada (-20°C) utilizando-se objetivas de imersão em água (40x com abertura numérica de 0,75 ou 63x com abertura numérica de 0,95). As imagens coletadas pela câmera eram processadas e visualizadas em microcomputador utilizando-se o programa Axon Image Workbench. A luz utilizada para iluminar a preparação provinha de uma lâmpada de mercúrio e passava por filtros de 505/530nm para seleção do espectro da fluoresceína, adequado à excitação do marcador FM1-43. Todas as variáveis de ajuste da imagem como, por exemplo, tempo de exposição e *binning* eram mantidas constantes para imagens obtidas num mesmo experimento.

A análise das imagens e a mensuração dos níveis de fluorescência foram realizadas utilizando-se os programas Metamorph 4.0 e Microsoft Excel. Os dados obtidos

eram normalizados percentualmente e convertidos em representações gráficas através do programa Sigma Plot 9.0. A análise estatística era realizada pela aplicação do teste *t-student* pareado.

3.2- Registro dos efeitos da ouabaína sobre liberação vesicular

Terminações motoras marcadas com FM1-43, visualizadas em microscópio de fluorescência, eram submetidas à ouabaína por meio da adição do glicosídeo à solução fisiológica em concentrações variando de 1 μ M a 100 μ M. Após aplicação da droga, obtinham-se imagens das terminações em intervalos de 10 minutos até que se completasse uma hora de tratamento com o derivado esteróide.

3.3- Análise do papel do Na⁺ e do Ca²⁺ extracelular

Nos experimentos em que foi investigado o papel do Na⁺ extracelular na exocitose evocada pela ouabaína, fez-se a substituição equimolar do NaCl (Cloreto de Sódio) pelo LiCl (Cloreto de Lítio) e pelo ChCl (Cloreto de Colina). Por sua vez, nos experimentos sobre o envolvimento do Ca²⁺ extracelular na liberação vesicular induzida pela ouabaína, procedeu-se a substituição equimolar do CaCl₂ (Cloreto de Cálcio) pelo MgCl₂ (Cloreto de Magnésio) e adição do quelante extracelular de cálcio EGTA (2mM). Os meios modificados, desprovidos de sódio ou cálcio, eram adicionados à preparação após remoção da solução salina normal. Depois de 15 minutos de incubação em Ringer modificado, fazia-se a adição de ouabaína, sendo as imagens coletadas a cada 10 minutos até o fim do experimento, geralmente após uma hora de tratamento com o glicosídeo.

3.4 - Análise dos efeitos da ouabaína sobre endocitose

Preparações de junção neuromuscular de rã foram incubadas em meio normal contendo ouabaína e FM1-43 durante 30 minutos. Após este tempo, era feita a lavagem em meio normal por pelo menos uma hora e em seguida as imagens eram coletadas.

Em alguns experimentos, após uma hora de pré-incubação em Ringer normal contendo ouabaína, os músculos foram submetidos à estimulação elétrica na presença de FM1-43. Após lavagem em solução salina, as imagens eram coletadas.

Para investigar se os efeitos da ouabaína sobre a endocitose eram reversíveis, preparações pré-incubadas com ouabaína durante uma hora foram, em seguida, submetidas à lavagem em solução salina normal por 60 minutos. Ao final do tempo de lavagem, as preparações foram estimuladas eletricamente na presença de FM1-43 e, após lavagem para remoção do excesso da sonda aderido à membrana das células musculares, as imagens eram obtidas no microscópio de fluorescência.

Para verificar a possibilidade de inibição da endocitose pela ouabaína ser decorrente de acidificação do terminal pré-sináptico, procedeu-se a pré-incubação de preparações de junção neuromuscular em meio contendo 60mM de NH_4Cl (Cloreto de Amônio) durante uma hora, seguida por marcação com ouabaína na presença de FM1-43 e NH_4Cl .

4 - Resultados

4.1 - Marcação dos aglomerados vesiculares com FM1-43

Terminações motoras foram marcadas por meio da aplicação de estímulo elétrico (20Hz, 10min), via eletrodo de sucção, sobre o fragmento de nervo responsável pela inervação do músculo peitoral cutâneo de rã em meio contendo FM1-43 (4 μ M). As terminações axonais marcadas, visualizadas em microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera de CCD (*charge-coupled device*), apresentavam um padrão característico com presença de pontos fluorescentes enfileirados ao longo da terminação, assemelhando-se a um colar de pérolas (figura 5A). Cada ponto fluorescente representava aglomerados de vesículas sinápticas contendo FM1-43 em seu interior, sendo que o marcador foi captado durante a endocitose compensatória após liberação vesicular induzida pela estimulação elétrica. Portanto, cada ponto fluorescente indicava local de contato sináptico ao longo da terminação axonal.

O FM1-43, se exposto prolongadamente à luz polarizada, apresenta redução da intensidade do sinal fluorescente, fenômeno conhecido como *fotodesmarcação* (*photobleaching*). Para mensuração dos níveis de *fotodesmarcação*, terminações marcadas com FM1-43 foram submetidas à luz polarizada em intervalos de tempo de 10 minutos ao longo de uma hora de experimento, sendo o tempo de exposição equivalente ao tempo de obtenção das imagens. Ao final de uma hora, as terminações marcadas sofriam uma redução de aproximadamente 18% na intensidade do sinal fluorescente (figura 5B e 5C). A curva de *fotodesmarcação* foi utilizada como controle para os experimentos realizados com ouabaína (figura 5F).

4.2- Ouabaína induz liberação vesicular

Na literatura, vários trabalhos, utilizando diferentes modelos experimentais, indicam que a ouabaína promove liberação de neurotransmissores (Vizi, 1972; Gomez, *et al.*, 1975; Haimann *et al.*, 1985; Prado *et al.*, 1993; Casali *et al.*, 1995; Lomeo *et al.*, 2003). Diante disso, para análise dos efeitos da inibição da Na^+, K^+ -ATPase sobre os aglomerados de vesículas sinápticas em junção neuromuscular de rã, terminações marcadas com FM1-43 foram incubadas em meio contendo ouabaína em diferentes concentrações. Após 60 minutos de tratamento, houve desmarcação dos pontos fluorescentes, indicando ocorrência de liberação vesicular com consequente extrusão do FM1-43 para o meio (figuras 5D a 5F). Análise estatística demonstrou que a queda de fluorescência após tratamento com 10, 50 e 100 μM de ouabaína é significativa em relação à *fotodesmarcação*, confirmando a ocorrência de exocitose evocada pelo glicosídeo de maneira dependente do tempo de incubação e da dose utilizada (figura 5F).

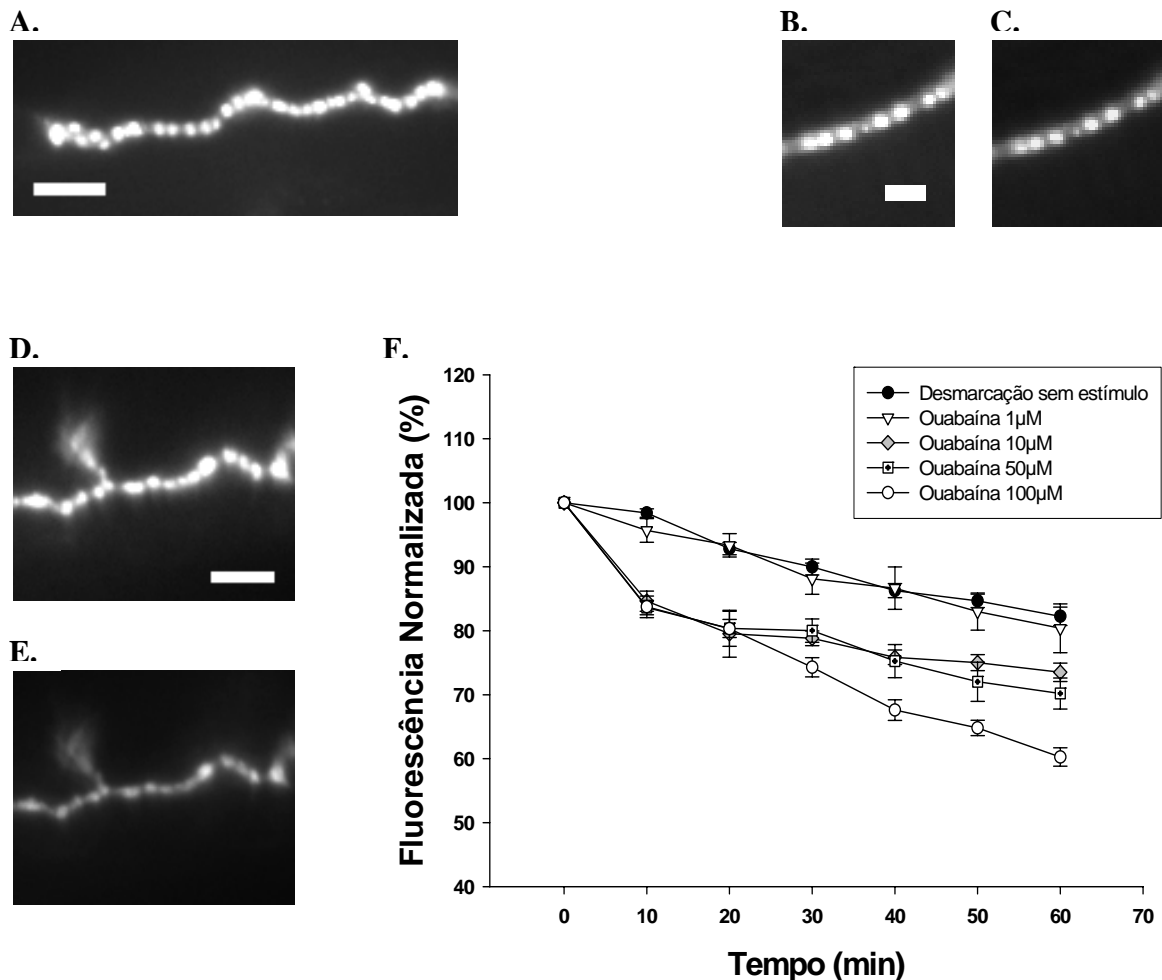


Figura 5: Ouabaina promove liberação vesicular com conseqüente desmarcação de terminações axonais contendo FM1-43. (A) Padrão de marcação típico de uma terminação axonal com pontos fluorescentes enfileirados como um colar de pérolas. (B) Imagem de terminal axonal marcado com FM1-43 no início de um experimento. (C) Terminal axonal ao final de uma hora de experimento com exposições à luz polarizada em intervalos de 10 minutos para coleta de imagens. Redução do sinal fluorescente representa desmarcação sem estímulo (*fotodesmarcação*) por iluminação repetida da preparação. (D) Terminação marcada com FM1-43 imediatamente antes da aplicação de ouabaina. (E) Terminação axonal ao final de uma hora de tratamento com ouabaina a 100µM. Desmarcação indica excitação evocada pelo glicosídeo. (Barra de escala: 10µm em “A” e “D”; 5µm em “B”). (F) Gráfico demonstrando que a excitação evocada pela ouabaina é dependente da dose e do tempo de incubação com o glicosídeo. Ao final de uma hora, a desmarcação induzida pela ouabaina é significativa em relação à *fotodesmarcação* ($P < 0,05$) para três das quatro concentrações utilizadas. (Média de quatro experimentos para desmarcação com 1, 10 e 50µM de ouabaina. Média de seis experimentos para desmarcação sem estímulo e desmarcação com 100µM de ouabaina. Barra representa erro padrão).

4.3 - Liberação vesicular evocada pela ouabaína depende da presença de íons Na⁺ no meio extracelular

Considerando que a ouabaína é um inibidor específico da Na⁺,K⁺-ATPase, ela cria uma condição que favorece o acúmulo de Na⁺ no interior das células (Birks & Cohen, 1968; Gomez *et al.*, 1975; Aizman *et al.*, 2001; McFadden *et al.*, 2001). Para investigar o papel dos íons Na⁺ na exocitose evocada pela ouabaína, foram realizados experimentos em que se fez a substituição equimolar do NaCl (Cloreto de Sódio) do meio pelo LiCl (Cloreto de Lítio). Preparações marcadas com FM1-43 e incubadas em meio desprovido de Na⁺ não sofrem desmarcação significativa após 60 minutos de aplicação de 100µM de ouabaína (figura 6A a 6C), indicando que a liberação vesicular evocada pelo glicosídeo é dependente da presença de íons Na⁺ no meio extracelular.

Para confirmação da dependência do Na⁺ extracelular na liberação vesicular induzida pela ouabaína, terminações marcadas com FM1-43 foram incubados por 30 minutos em meio modificado com substituição equimolar do NaCl pelo LiCl na presença de ouabaína. Durante esse período, não ocorreu desmarcação significativa em relação à curva de *fotodesmarcação* (figura 6D). Contudo, imediatamente após 30 minutos, fez-se a substituição do meio modificado por Ringer normal contendo NaCl e o glicosídeo (seta na figura 6D). Procedida a troca dos meios, a curva de desmarcação tomou uma trajetória descendente, confirmando que a exocitose evocada pela ouabaína depende da presença de íons Na⁺ no meio extracelular (figura 6D). Resultado semelhante foi obtido quando se fez a substituição equimolar do NaCl pelo ChCl (cloreto de colina) (figura 7).

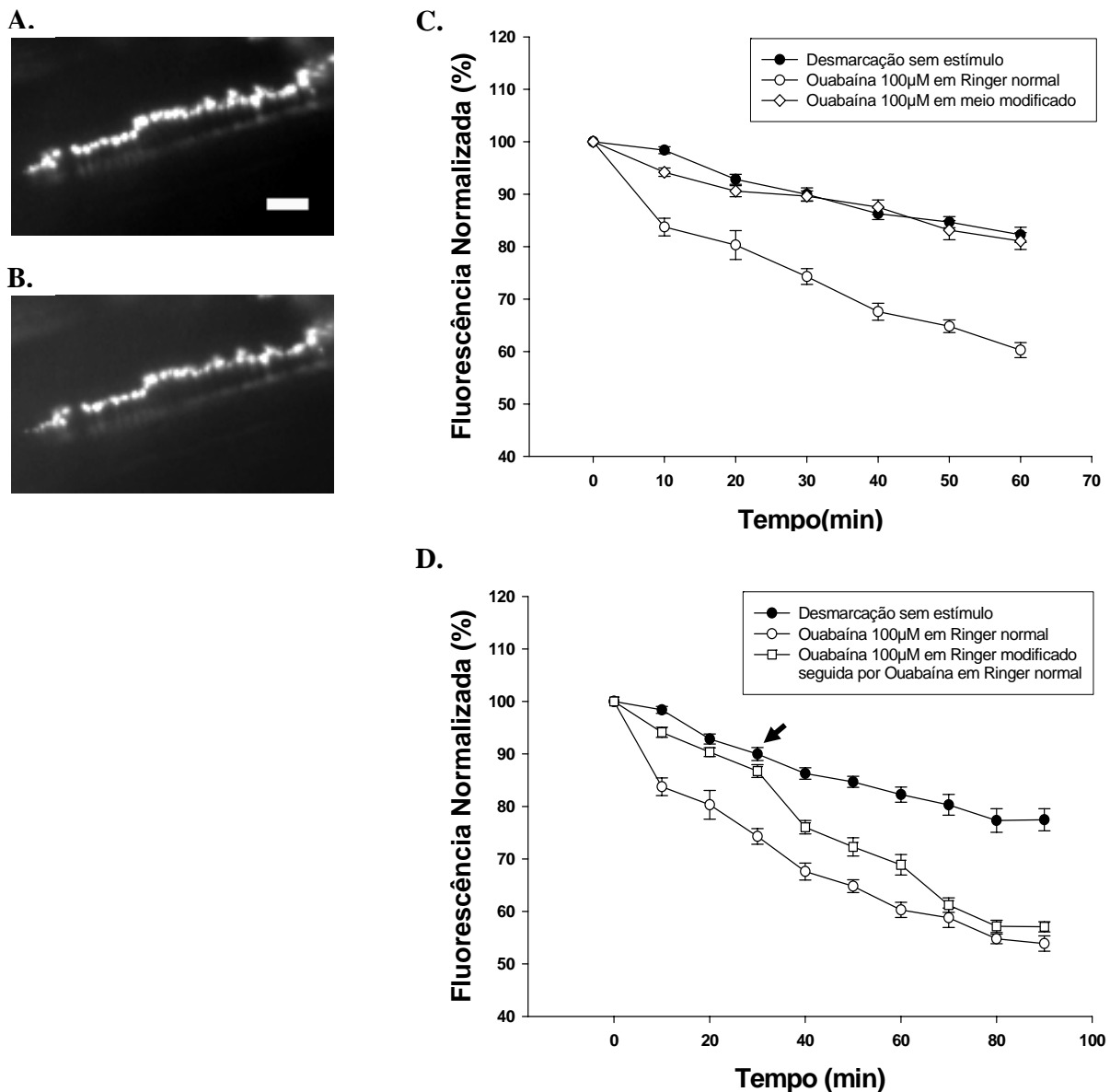


Figura 6: Liberação vesicular evocada pela ouabaína depende da presença de íons sódio no meio extracelular. (A) Terminação marcada com FM1-43. (Barra de escala: 10µm) (B) Imagem obtida após uma hora de tratamento com ouabaína em meio modificado pela substituição equimolar do NaCl (cloreto de sódio) pelo LiCl (cloreto de lítio). (C) Gráfico comparativo entre desmarcação induzida pela ouabaína em Ringer normal e desmarcação induzida pelo glicosídeo em meio modificado, desprovido de íons Na⁺. Na ausência de íons Na⁺, a curva de desmarcação está praticamente sobreposta à curva de *fotodesmarcação* (P>0,05 ao final de uma hora. Média de três experimentos). (D) Desmarcação pela ouabaína em meio modificado durante 30 minutos iniciais do experimento. Após adição de Ringer normal e ouabaína (seta), a curva de desmarcação toma trajetória descendente e se aproxima da desmarcação pelo glicosídeo em meio normal durante 90 minutos. (Os dados representam a média de três experimentos. Barra representa erro padrão)

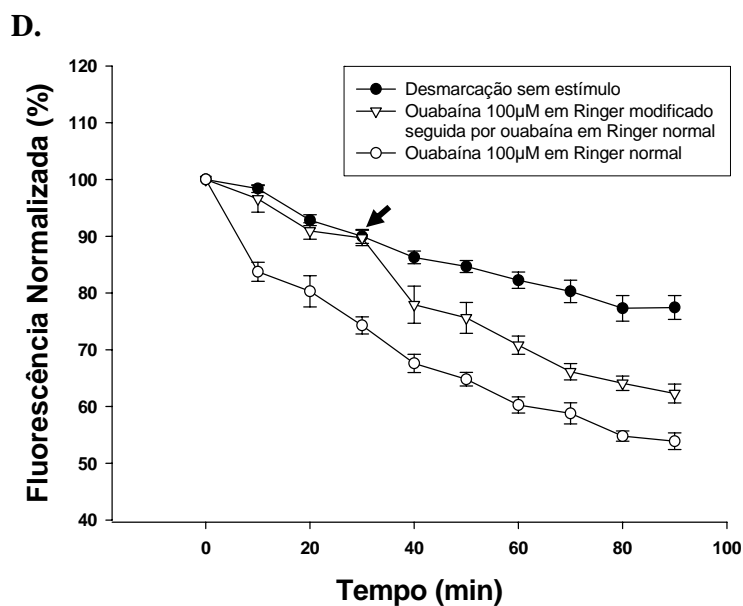


Figura 7: Dependência de íons sódio no meio extracelular para liberação vesicular evocada pela ouabaína. **(A)** Imagem inicial de uma terminação axonal marcada com FM1-43. (Barra de escala:10µm). **(B)** Imagem da mesma terminação mostrada em “A” após 30min de tratamento com ouabaína a 100µM em meio modificado pela substituição equimolar do NaCl pelo ChCl (cloreto de colina). **(C)** Imagem obtida após uma hora da substituição do meio modificado por Ringer normal contendo NaCl e ouabaína. **(D)** Desmarcação pela ouabaína em meio modificado com substituição equimolar do NaCl pelo ChCl (30min iniciais). Após adição de Ringer normal acrescido de ouabaína (seta), a curva de desmarcação toma trajetória descendente e se aproxima da desmarcação evocada pelo glicosídeo em meio normal durante 90 minutos. (Média de três experimentos. Barra representa erro padrão).

4.4 - Liberação vesicular evocada pela ouabaína independe da presença de íons Ca^{2+} no meio extracelular

Classicamente, é bem definido que o influxo de íons Ca^{2+} através de canais de cálcio dependentes de voltagem dispara a liberação de vesículas sinápticas e exocitose de neurotransmissores (revisado por Katz, 1966 e Murthy & De Camilli, 2003). Sendo assim, para verificar o papel do Ca^{2+} extracelular na exocitose evocada pela Ouabaína, foram realizados experimentos em que se fez a substituição equimolar do CaCl_2 (Cloreto de Cálcio) presente no meio pelo MgCl_2 (Cloreto de Magnésio). Terminações marcadas com FM1-43 foram incubadas em meio desprovido de Ca^{2+} , contendo 2mM do quelante extracelular de cálcio EGTA e 100 μM de ouabaína. Após uma hora de tratamento, a desmarcação dos pontos fluorescentes induzida pelo glicosídeo foi equivalente à desmarcação na presença de Ca^{2+} de modo que as duas curvas praticamente se sobrepõem (figuras 8). Portanto, a exocitose evocada pela ouabaína independe da presença de íons cálcio no meio extracelular, diferentemente do mecanismo fisiológico classicamente descrito de liberação vesicular disparada pelo influxo desse íon pelo terminal pré-sináptico.

Diante dos dados apresentados anteriormente e da existência de trabalhos indicando recrutamento de estoques intracelulares de cálcio na exocitose evocada pela ouabaína (Lomeo *et al.*, 2003), tornava-se imperativo investigar o papel do cálcio intracelular na liberação de vesículas sinápticas em junção neuromuscular de rã. Terminações axonais marcadas com FM1-43 foram então incubadas com 100 μM de BAPTA-AM, um quelante intracelular de cálcio, durante 30 minutos prévios a aplicação de ouabaína. Contudo, o BAPTA-AM interferiu com a fluorescência do FM1-43, determinando uma acentuada redução do sinal do marcador mesmo na ausência do glicosídeo (figura 9), inviabilizando o emprego do quelante em modelos experimentais de monitoramento do ciclo sináptico utilizando FM.

Tendo em vista a impossibilidade de utilização do BAPTA-AM, experimentos preliminares utilizando TMB-8 e azulmuleno, bloqueadores do receptor de rianodina presente no retículo endoplasmático, mostram inibição da desmarcação de terminais axonais pela ouabaína, indicando que o glicosídeo promove recrutamento de estoques

intracelulares de cálcio. Além disso, experimentos com inibidor do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial CGP37157 também apontam para um possível recrutamento pela ouabaína de cálcio armazenado em mitocôndrias. Estes experimentos necessitam de maior confirmação e futuramente serão apresentados em trabalho complementar a este.

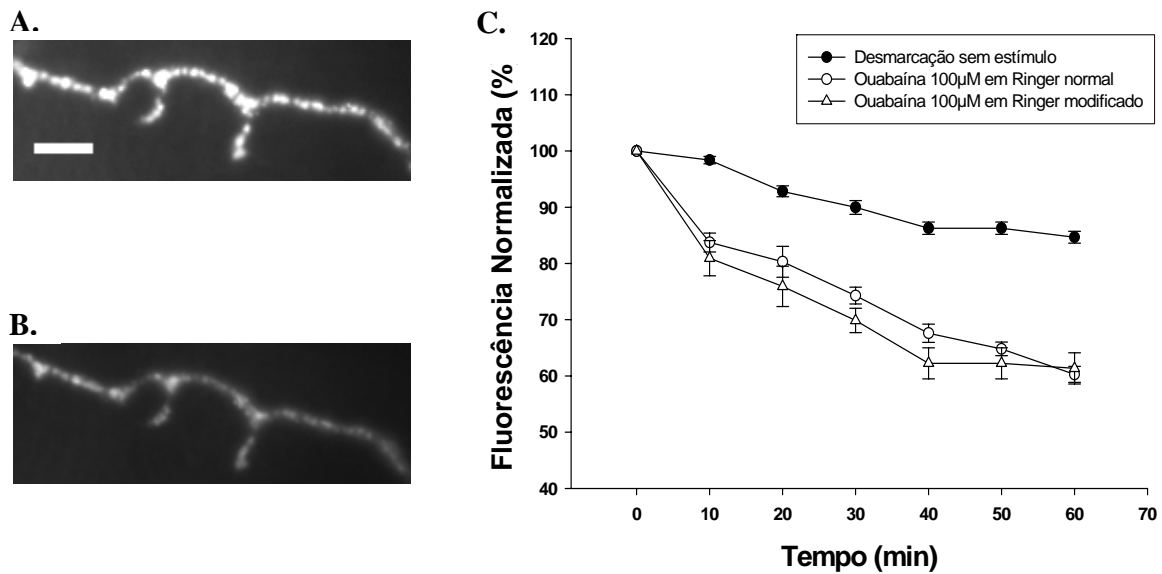


Figura 8: Liberação vesicular evocada pela ouabaína independente da presença de íons cálcio no meio extracelular. (A) Imagem de uma terminação marcada com FM1-43. (Barra de escala: 10μm). (B) Imagem coletada após uma hora de tratamento com 100μM de ouabaína em meio modificado pela substituição equimolar do CaCl₂ (cloreto de cálcio) pelo MgCl₂ (cloreto de magnésio) e adição de 2mM do quelante extracelular de cálcio EGTA. (C) Gráfico demonstrando que a intensidade e cinética de desmarcação induzida pela ouabaína são semelhantes na presença ou ausência de cálcio extracelular. (Média de três experimentos para desmarcação em meio desprovido de cálcio. Barra representa erro padrão).

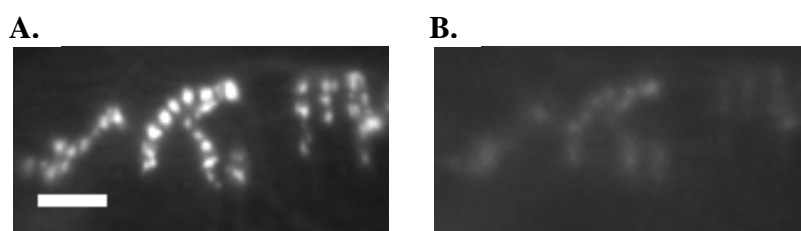


Figura 9: BAPTA-AM interfere com o sinal fluorescente emitido pelo FM1-43. (A) Imagem de terminação motora marcada com FM1-43 antes da aplicação do quelante intracelular de cálcio BAPTA-AM. (Barra de escala: 10μm). (B) Imagem obtida sobre o mesmo campo visual apresentado em “A” logo após a adição de 100μM de BAPTA-AM ao Ringer modificado pela substituição equimolar do CaCl₂ pelo MgCl₂.

4.5 - Ouabaína inibe endocitose

Em análises ultra-estruturais de junção neuromuscular de rã submetidas a tratamento com ouabaína, Haimann *et al.* (1985) observaram a ocorrência de depleção de aglomerados vesiculares, surgimento de grandes invaginações de membrana e a ausência de marcação com *horseradish peroxidase* (HRP). Estes resultados indicavam comprometimento da endocitose pelo glicosídeo. Diante disso, foram realizados experimentos com intuito de se investigar quais as implicações da ouabaína sobre a endocitose e captação de FM1-43. Preparações não marcadas foram então incubadas durante 30 minutos em meio contendo 100 μ M de ouabaína e 4 μ M de FM1-43. Após este período, as preparações foram lavadas em meio normal e examinadas ao microscópio de fluorescência. As imagens obtidas mostravam terminações axonais vazias sem a marcação pontuada típica, indicando que a ouabaína induz exocitose, mas bloqueia a endocitose e consequente captação de FM1-43 (figura 10A e 10B). Para confirmar inibição da endocitose pela ouabaína, preparações não marcadas foram pré-incubadas em meio contendo 100 μ M do glicosídeo durante 60 minutos e então submetidas à estimulação elétrica (20Hz por 10min) na presença de FM1-43. As imagens obtidas mostravam terminações axonais vazias, sem os pontos fluorescentes típicos (figura 10C), reforçando as evidências de inibição da endocitose pelo glicosídeo. Mesmo preparações pré-incubadas com ouabaína durante 60 minutos, submetidas a lavagens prolongadas (uma hora) em meio normal desprovido do glicosídeo não apresentavam marcação típica com FM1-43 após estimulação elétrica (figura 10D). Estes achados indicam que a inibição da endocitose pela ouabaína é duradoura e persiste mesmo após remoção do glicosídeo.

Na literatura existem dados demonstrando que a redução do pH no interior dos terminais pré-sinápticos em junção neuromuscular de lagarto determina inibição da endocitose e, por conseguinte, impede captação de FM1-43 (Lindgren, *et al.*, 1997). Para investigar se a inibição da endocitose pela ouabaína era decorrente de uma redução do pH intraterminal, músculos foram pré-incubados durante 30 minutos em meio contendo 60mM de NH₄Cl (Cloreto de Amônio), composto que tampona íons H⁺ e neutraliza a acidez no interior do terminal pré-sináptico. Em seguida, aplicava-se meio contendo 100 μ M de ouabaína e 4 μ M de FM1-43 por 30 minutos. As imagens coletadas mostravam que as

terminais axonais ainda apresentavam-se vazias (figura 11). Mesmo se as preparações fossem submetidas a estímulo elétrico (20Hz,10min) na presença de FM1-43 após pré-incubação com ouabaína e NH_4Cl , os terminais axonais não apresentavam marcação típica com pontos fluorescentes (dados não mostrados). Esses resultados indicam que a ouabaína inibe a endocitose através de mecanismo distinto da acidificação do terminal pré-sináptico.

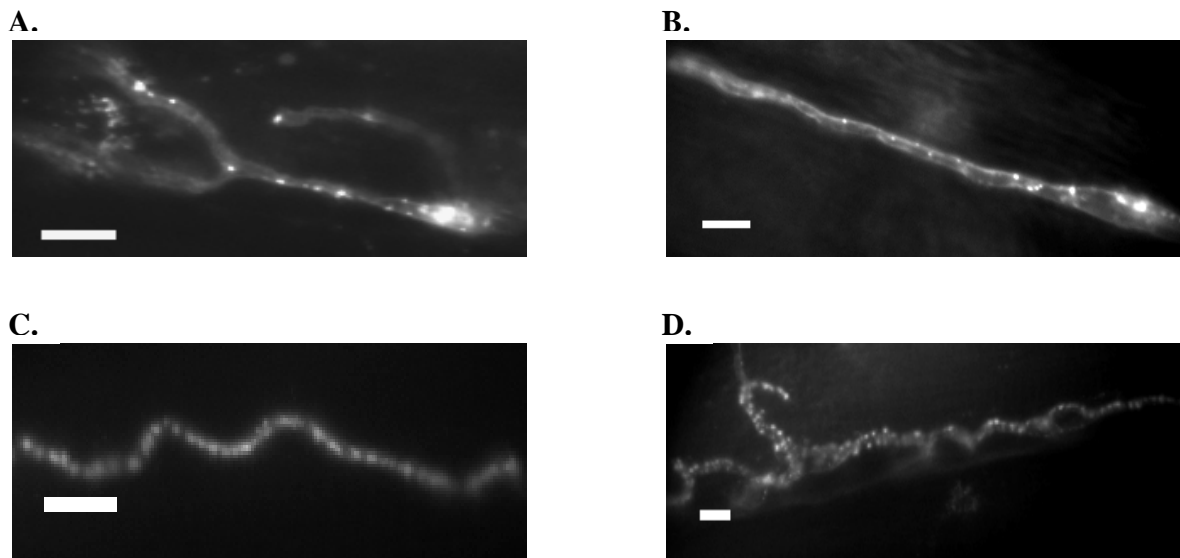


Figura 10: Inibição da endocitose pela ouabaína. **(A e B)** Terminações axonais incubadas com ouabaína a $100\mu\text{M}$ na presença de FM1-43 a $4\mu\text{M}$ durante 30 minutos. Embora a ouabaína promova exocitose, ela inibe a endocitose e captação de FM de modo que não se pode observar o aspecto de “colar de pérolas” típico de junção neuromuscular de anfíbio. **(C)** Após pré-incubação com $100\mu\text{M}$ de ouabaína, a preparação foi submetida a estímulo elétrico (20Hz, 10 minutos) na presença de FM1-43. Novamente, não é possível observar marcação característica de terminação motora de anfíbio. **(D)** Preparação submetida a tratamento com $100\mu\text{M}$ de ouabaína por 60 minutos, seguido por uma hora de lavagem em solução salina desprovida do glicosídeo. Por fim, a preparação foi submetida à estimulação elétrica (20Hz, 10 minutos) na presença de FM. A inibição da endocitose e captação de FM1-43 é mantida mesmo após períodos prolongados de lavagem. (Barra de escala para todas as imagens: $10\mu\text{m}$).

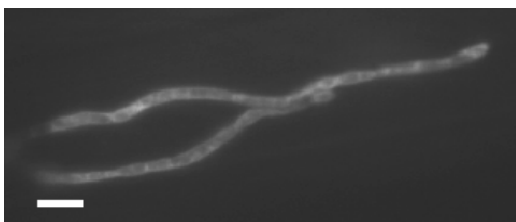


Figura 11: Inibição da endocitose pela ouabaína não se deve à acidificação do terminal pré-sináptico. Pré-incubação por uma hora com 60mM de NH_4Cl (cloreto de amônio) antes do tratamento com $100\mu\text{M}$ de ouabaína na presença de FM1-43. O NH_4Cl não reverte a inibição da endocitose pela ouabaína. (Barra de Escala: $10\mu\text{m}$).

5 - Discussão

5.1 - Marcação de vesículas sinápticas com FM1-43

A sonda fluorescente FM1-43 foi utilizada neste trabalho para marcação de vesículas e monitoramento do ciclo sináptico em junção neuromuscular de rã. A molécula de FM1-43 é anfipática e apresenta afinidade pela membrana celular graças a sua cauda hidrofóbica, possibilitando que o marcador seja captado pelas vesículas durante a endocitose e que aglomerados vesiculares contendo o marcador sejam visualizados em microscópio de fluorescência. Com a exocitose, ocorre liberação e difusão da sonda para o meio, resultando em redução do sinal fluorescente dos estoques vesiculares.

Com intuito de promover exocitose, estimulação elétrica de alta frequência (20Hz, 10min) foi utilizada por ser uma técnica que se assemelha ao disparo fisiológico desencadeado pela passagem de um potencial de ação pelo terminal axonal com subsequente ativação de canais de cálcio sensíveis à voltagem. Após liberação vesicular, durante a endocitose compensatória, os aglomerados vesiculares foram reconstituídos com vesículas contendo moléculas de FM1-43 e se apresentavam ao microscópio de fluorescência como pontos brilhantes enfileirados e, geralmente, dispostos longitudinalmente ao longo do trajeto das fibras musculares. Este é o padrão típico de marcação de terminações axonais motoras em músculo estriado esquelético de anfíbio, sendo possível estabelecer uma relação de semelhança com um colar de pérolas (Guatimosim *et al.*, 1998). Cada ponto fluorescente representa aglomerados vesiculares associados às zonas ativas e em aposição aos agrupamentos de receptores de acetilcolina presentes na membrana pós-sináptica. Portanto, esses círculos fluorescentes indicam regiões de contato sináptico (Betz *et al.*, 1992).

A qualidade das imagens obtidas, com o padrão puntiforme clássico, indica que o protocolo de marcação com estímulo elétrico é viável e adequado ao estudo do ciclo sináptico em junção neuromuscular de rã, além de confirmar a excelência do FM1-43 como ferramenta de monitoramento, em tempo real, dos passos de exocitose e endocitose de vesículas sinápticas em preparações não submetidas a nenhum processo de fixação.

5.2 - Ouabaína e liberação vesicular

Considerando que o FM1-43 está contido no interior de vesículas sinápticas, aderido a sua parede, e não atravessa livremente as membranas celulares em virtude de ser uma molécula com cabeça carregada positivamente, a redução na intensidade do sinal fluorescente emitido pelos *pools* vesiculares representa duas possibilidades: desmarcação sem estímulo (*fotodesmarcação*) ou liberação vesicular (Betz *et al.*, 1992).

Para mensuração dos níveis de *fotodesmarcação*, foram realizados experimentos em que eram obtidas imagens de terminações marcadas com FM1-43 em intervalos definidos de 10 minutos na ausência de qualquer estímulo que desencadeasse exocitose. Foi possível observar uma redução de aproximadamente 18% na intensidade da marcação com FM1-43 ao longo dos experimentos, indicando o grau de queda do sinal por exposição repetida à luz polarizada durante coleta de imagens. Embora o FM1-43 seja relativamente estável, é preciso salientar que, durante a realização dos experimentos, as preparações eram mantidas à temperatura ambiente e a ocorrência de liberação vesicular espontânea também contribuía para a desmarcação sem estímulo.

Quando os terminais axonais marcados com FM1-43 eram submetidos ao tratamento com ouabaína, ocorria redução, ao longo do tempo, da intensidade do sinal fluorescente emitido pelos aglomerados vesiculares marcados com a sonda. A curva de desmarcação das terminações tratadas com ouabaína está abaixo da curva de photobleaching em valores significativos para três das quatro concentrações de ouabaína utilizadas, sendo que a desmarcação mais significativa, aproximadamente 40%, foi obtida após incubação das preparações com ouabaína a 100 μ M. Esse grau de desmarcação é menos pronunciado que a desmarcação observada após estímulo elétrico (20Hz, 10min) que promove uma redução de aproximadamente 60% na intensidade do sinal fluorescente de agrupamentos vesiculares marcados com FM1-43 ao final de 10 minutos de estimulação (Amaral *et al.*, dados não publicados). Contudo, as curvas de desmarcação com ouabaína indicam claramente que este glicosídeo promove liberação vesicular de maneira dependente do tempo de incubação e da dose utilizada. Esta liberação de vesículas marcadas com FM1-43 evocada pelo derivado esteróide ouabaína está em consonância com achados eletrofisiológicos que apontam aumento da frequência de potenciais em miniatura (MEPPs)

após tratamento de junções neuromusculares com este e outros glicosídeos cardíacos até um momento em que se tem bloqueio da transmissão sináptica por depleção dos aglomerados vesiculares (Birks & Cohen, 1968; Haimann *et al.*, 1985). Além disso, os dados obtidos com FM1-43 estão em conformidade com imagens de microscopia eletrônica que mostram intensa redução dos *pools* vesiculares após tratamento com ouabaína (Haiman *et al.*, 1985).

A desmarcação das terminações axonais carregadas com FM1-43 refletindo liberação vesicular confirma o aumento da liberação de acetilcolina marcada radioativamente em fatias corticais de cérebro de rato expostas à ouabaína (Vizi, 1972; Gomez *et al.*, 1975; Casali, *et al.*, 1995; Lomeo *et al.*, 2003).

5.3 - Papel dos íons Na⁺ e Ca²⁺ na exocitose evocada pela ouabaína

Classicamente, é bem estabelecido que a propagação de um potencial de ação pelo terminal axonal com conseqüente ativação de canais de cálcio sensíveis à voltagem, permitindo o rápido influxo desse íon para o citosol, constitui o mecanismo fisiológico que determina disparo da exocitose (Katz, 1966; Robitaille *et al.*, 1990; revisado por Murthy & De Camilli, 2003). Contudo, a análise dos experimentos em que se fez a substituição equimolar do Ca²⁺ presente na solução salina por Mg²⁺, juntamente com a adição do quelante extracelular de cálcio EGTA, mostrou curva de desmarcação pela ouabaína semelhante à desmarcação em meio normal com Ca²⁺. Portanto, a ouabaína promove liberação vesicular independentemente do cálcio extracelular, contrariando o mecanismo clássico de exocitose. Entretanto, como já mencionado, parecem existir diferenças teciduais e celulares na resposta à ouabaína na medida que em experimentos realizados com neurônios de gânglio simpático de gato, a liberação de neurotransmissor evocada pelo glicosídeo mostrou-se dependente da presença de cálcio no meio (Prado *et al.*, 1993).

Segundo Adam-Vizi (1992), existem três possibilidades, à priori, de liberação vesicular independente do cálcio extracelular: (1) liberação independente de Ca²⁺ extracelular, mas dependente do recrutamento de reservas intracelulares desse íon como retículo endoplasmático e mitocôndria. (2) Liberação completamente independente de cálcio, mas que se processa através dos mesmos mecanismos e usufrua da mesma maquinaria molecular que a liberação evocada pelo cálcio. Isto remete a possibilidade de

liberação vesicular disparada por outros íons como o sódio (Nordmann & Stuenkel, 1991; Nordmann *et al.*, 1992; Meunier *et al.*, 1997). (3) Liberação completamente independente de cálcio e processada por meio de mecanismos distintos da liberação disparada por este íon.

Não é objetivo deste trabalho revisar todas as formas de liberação vesicular independentes da presença de cálcio no meio, contudo, são inúmeras as condições que, além da ouabaína, promovem liberação de neurotransmissores mesmo na ausência de cálcio extracelular como, por exemplo, ionóforos de sódio, veratridina, condições hipóxicas, etanol, ácidos graxos insaturados, α -latrotoxina. Interessante observar que todas essas condições apresentam aspectos em comum como: (a) uma cinética de liberação mais lenta que a observada na liberação disparada pelo cálcio e (b) uma menor dependência do potencial de membrana de modo que mesmo após pequenas alterações em relação ao potencial de repouso é possível registrar liberação de neurotransmissor. Este comportamento é diferente da liberação mediada pelo influxo de cálcio que demonstra a necessidade de ultrapassar limiares de despolarização mais altos para disparar a exocitose (revisado por Adam-Vizi, 1992).

A liberação vesicular independente do cálcio extracelular, como já mencionado no último parágrafo, é observada em modelos experimentais de junção neuromuscular submetidos à α -latrotoxina, purificada do veneno da aranha viúva negra. Esta toxina, assim como a ouabaína, promove aumento da frequência de potenciais pós-sinápticos em miniatura independentemente da presença de cálcio no meio (Longenecker *et al.*, 1970), determina acúmulo intracitoplasmático de íons sódio com conseqüente reversão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial, resultando em aumento dos níveis intracelulares do íon divalente. Contudo, a liberação de vesículas evocada pela α -latrotoxina se mostrou preservada em meio desprovido de sódio e também após adição do quelante intracelular de cálcio BAPTA-AM. Portanto, a exocitose evocada pela α -latrotoxina pode ser desencadeada por um mecanismo ainda não totalmente definido, mas distinto da liberação regulada pelo cálcio (Tsang *et al.*, 2000). Por sua vez, a ouabaína aumenta a frequência de MEEPs e induz liberação independente de cálcio extracelular, porém seu efeito como secretagogo depende do acúmulo citosólico de íons sódio e subseqüente recrutamento de estoques intracelulares de cálcio (Lomeo *et al.*, 2003). Essa divergência quanto a necessidade do acúmulo citoplasmático de sódio e recrutamento de reservas intracelulares de cálcio para

desencadear liberação vesicular mostra que a ouabaína e α -latrotoxina, embora determinem respostas secretórias semelhantes com aumento da frequência de MEEPs, têm mecanismos de atuação bem distintos.

Outra substância que desencadeia aumento da frequência de potenciais pós-sinápticos em miniatura e depleção de aglomerados vesiculares em junção neuromuscular independentemente da ativação de canais de sódio sensíveis à voltagem é o CCCP (carbonil cianeto *m*-clorofenildrazona). Este agente é um protonóforo e desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial que promove vazamento de cálcio armazenado em mitocôndrias, desencadeando um aumento da liberação quantal espontânea com conseqüente depleção de vesículas sinápticas a ponto de determinar bloqueio da liberação quantal evocada. Estes efeitos são mantidos mesmo na ausência de cálcio extracelular ou quando este íon é substituído por estrôncio (Molgó & Pecot-Dechavassine, 1988). Após tratamento com CCCP, análises morfológicas ao microscópio eletrônico de transmissão evidenciaram grande redução no número de vesículas sinápticas, dilatação mitocondrial e presença de inúmeras cisternas, indicando comprometimento da reciclagem vesicular (Molgó & Pecot-Dechavassine, 1988). Estes achados são muito semelhantes aos encontrados após tratamento com ouabaína, fortalecendo a possibilidade de que o cálcio armazenado em mitocôndria também seja mobilizado pelo glicosídeo.

Diante da independência do cálcio extracelular para a liberação vesicular induzida pela ouabaína e considerando-se a existência de trabalhos sugerindo participação de reservas intracelulares de cálcio no mecanismo de ação do glicosídeo (Lomeo *et al.*, 2003), foi proposta a utilização do quelante intracelular de cálcio BAPTA-AM. No entanto, as preparações submetidas ao tratamento com BAPTA-AM apresentavam intensa perda de fluorescência mesmo na ausência de ouabaína, indicando que o quelante intracelular de cálcio interferia com o sinal fluorescente emitido pelo FM1-43, inviabilizando o estudo do recrutamento de estoques intracelulares de cálcio no mecanismo de ação da ouabaína com o BAPTA-AM. Essa interferência do BAPTA-AM com o sinal fluorescente do FM1-43 foi também observada em experimentos realizados em sinaptossomos submetidos a frações da toxina da aranha *Phoneutria nigriventer*. Mesmo na ausência da toxina ou de estímulo com alta concentração de potássio, era possível observar uma redução da fluorescência do FM1-

43 ao longo do tempo de exposição ao quelante intracelular de cálcio (Castro, 2006 por comunicação pessoal), confirmando o fato observado em junção neuromuscular.

Outra possibilidade para investigação do recrutamento de estoques intracelulares de cálcio pela ouabaína seria a utilização de inibidores dos receptores de rianodina e do inositol trifosfato. Ambos os receptores estão presentes na membrana do retículo endoplasmático, um importante reservatório de cálcio no interior do citoplasma. Em experimentos preliminares utilizando TMB-8 e Azulmuleno, inibidores do receptor de rianodina, foi possível observar redução da desmarcação dos aglomerados vesiculares contendo FM1-43 induzida pela ouabaína. Estes resultados indicam que o recrutamento do cálcio armazenado no retículo pelo glicosídeo contribui para a liberação vesicular e estão em conformidade com experimentos realizados em fatias corticais de cérebro de rato nos quais a liberação de acetilcolina triciada induzida pela ouabaína sofreu inibição após pré-incubação da preparação com dantrolene e tetracaína, inibidores do receptor de rianodina e do receptor do inositol trifosfato respectivamente (Lomeo *et al.*, 2003).

A ouabaína inibe especificamente a Na^+, K^+ ATPase, bomba iônica que mantém o equilíbrio eletroquímico entre as faces externa e interna da membrana plasmática, promovendo a extrusão de íons Na^+ e a intrusão de íons K^+ . Portanto, a ouabaína determina um acúmulo intracelular de Na^+ . A substituição do Na^+ do meio pelo Li^+ e pela Ch^+ inibiu a desmarcação dos *aglomerados* vesiculares contendo FM1-43 após aplicação de ouabaína, logo, a liberação de vesículas sinápticas induzida pelo glicosídeo é mediada pelo acúmulo intracitoplasmático de Na^+ .

Muitos trabalhos na literatura apontam relação entre o acúmulo intracelular de Na^+ e o aumento da liberação de neurotransmissores. O aumento citosólico do Na^+ poderia atuar como mecanismo regulador da neurotransmissão, favorecendo a ligação desse íon com domínios específicos de proteínas relacionadas com o disparo da liberação vesicular como a sinaptotagmina. O domínio C2b da sinaptotagmina, o qual interage com fosfolípidos de membrana, poderia se ligar secundariamente ao Na^+ em situações nas quais há grande disponibilidade desse íon (Meunier *et al.*, 1997) como acontece após inibição da Na^+, K^+ ATPase, disparando a liberação vesicular. Contudo, essa possibilidade não foi até o momento efetivamente comprovada e não recebe apoio consensual entre os pesquisadores. Parece mais plausível a possibilidade de que o acúmulo citosólico de Na^+ atue diretamente

sobre receptores de rianodina ou de inositol trifosfato, recrutando o cálcio armazenado no retículo como já mencionado anteriormente e sugerido em trabalhos realizados em fatias corticais de cérebro de rato (Lomeo *et al.*, 2003).

Outro aspecto importante é o fato de que o acúmulo intracitoplasmático de Na^+ poderia promover o vazamento de íons cálcio armazenados na mitocôndria por reversão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial. Existem dados conflitantes na literatura a cerca da participação desse mecanismo na liberação vesicular (veja Zhong *et al.*, 2001 e Yang *et al.*, 2003). Contudo, experimentos preliminares utilizando CGP37157, um inibidor do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial, mostram inibição da exocitose evocada pela ouabaína em junção neuromuscular de rã marcada com FM1-43. A esses dados somam-se os resultados eletrofisiológicos e morfológicos obtidos com CCCP, já mencionados anteriormente, e também a observação de que o CCCP promove desmarcação de *pools* vesiculares marcados com FM1-43 com intensidade e cinética muito semelhante à ouabaína, reforçando possível recrutamento de cálcio mitocondrial pelo glicosídeo.

O acúmulo de Na^+ no citosol decorrente da inibição da $\text{Na}^+,\text{K}^+\text{ATPase}$ pela ouabaína poderia determinar também a reversão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ da membrana do terminal pré-sináptico, promovendo a entrada de íons Ca^{2+} e disparo da liberação vesicular. Entretanto, a exocitose evocada pela ouabaína parece ser independente desse mecanismo já que, em experimentos realizados na ausência de cálcio extracelular, o glicosídeo determinou desmarcação semelhante à observada em meio normal contendo o referido íon divalente.

5.4 - Ouabaína e inibição da endocitose

O FM1-43, como já mencionado, é captado pelas vesículas durante a endocitose, possibilitando a visualização de aglomerados vesiculares sob a forma de pontos fluorescentes em preparações de junção neuromuscular examinadas ao microscópio de fluorescência. Logo, a não captação do marcador após um passo de exocitose desencadeado por estimulação elétrica indica comprometimento da reciclagem vesicular. Considerando que a ouabaína promove liberação vesicular, o próximo passo foi verificar os efeitos do derivado esteróide sobre a endocitose compensatória.

Preparações incubadas com ouabaína na presença de FM1-43 por tempo suficiente para que o ciclo exocitose/endocitose permitisse a incorporação do marcador no interior de vesículas sinápticas apresentavam-se com terminações vazias, sem o aspecto típico de colar de pérolas, indicando inibição da endocitose compensatória. A inibição da endocitose impedia inclusive a captação de FM1-43 em terminais axonais submetidos à estimulação elétrica após pré-incubação com ouabaína. Mesmo após lavagens prolongadas, a captação de FM1-43 por estimulação elétrica não era observada. Esse comprometimento da reciclagem confirma achados de microscopia eletrônica de transmissão que mostram a não captação de HRP, um marcador eletrodenso internalizado pelas vesículas durante endocitose, após tratamento com ouabaína (Haimann *et al.*, 1985). Além disso, é possível constatar, em análises ultra-estruturais, o surgimento de grandes invaginações de membrana, formando alças no interior do terminal axonal frequentemente associadas à cobertura de clatrina e ainda ligadas à axolema por longos pescoços (Haimann *et al.*, 1985). Essas observações, associadas à falha em se obter marcação com FM1-43 de terminais axonais pré-incubados com ouabaína, demonstram que o glicosídeo promove liberação vesicular, mas inibe a endocitose compensatória, aparentemente em passo posterior ao estabelecimento da capa de clatrina. A liberação de vesículas sinápticas não acompanhada de reciclagem dos aglomerados vesiculares é responsável pelo bloqueio da transmissão sináptica após períodos prolongados de incubação de preparações de junções neuromusculares com ouabaína, conforme observado em experimentos de eletrofisiologia e análises ultra-estruturais (Birks & Cohen, 1968; Haimann *et al.*, 1985). Este seria também o mecanismo responsável pelo aumento de volume dos terminais axonais registrado em micrografias eletrônicas de transmissão, resultando em incorporação da membrana vesicular à membrana do terminal pré-sináptico (Haiman, *et al.*, 1985).

Como anteriormente relatado, a redução do pH em preparações de junção neuromuscular inibe a endocitose e a captação de FM1-43 (Lindgren *et al.*, 1997). Contudo, a utilização de NH_4Cl , agente responsável pelo tamponamento de íons H^+ , inclusive no interior dos terminais axonais, não reverteu o bloqueio da reciclagem promovido pela ouabaína, não possibilitando a captação de FM1-43. Portanto, a inibição da endocitose pelo glicosídeo não se devia a algum fenômeno de acidificação do terminal pré-sináptico pelo derivado esteróide.

Embora não seja conhecido o mecanismo pelo qual a ouabaína inibe a endocitose, poderia-se propor que as alterações nos níveis de cálcio intracelular induzidas pelo glicosídeo sejam suficientes para desencadear a exocitose, porém não garantiriam a endocitose. Em neurônios bipolares da retina de peixe dourado, foi demonstrado que a dinâmica da endocitose acompanha as variações nos níveis intracelulares de cálcio (Von Gersdoff & Matthews, 1994). Contudo, em junções neuromusculares de rã, a dinâmica da endocitose parece ser, pelo menos em parte, distinta da dinâmica do cálcio intracelular e sim determinada pela duração da estimulação elétrica (Wu & Betz, 1996).

A impossibilidade de atribuir explicações precisas ao mecanismo de inibição da endocitose pela ouabaína exige que estudos com abordagens celulares e moleculares mais detalhadas sejam realizados no futuro.

Embora a Ouabaína seja um derivado esteróide que atue inibindo a Na^+, K^+ -ATPase, uma proteína de membrana, não se pode descartar a possibilidade de que este glicosídeo atue sobre sítios específicos no interior das células. Recentemente, associação entre uma proteína de 31,5 KD presente no sistema de túbulos T de cardiomiócitos de gato e ouabaína foi relatada. A interação do glicosídeo com seu receptor protéico intracelular batizado de NORP (*new 31,5-KD ouabain receptor protein*) teria relação com a potencialização do efeito inotrópico do glicosídeo (Fujino & Fujino, 1995). A existência de alvos intracelulares abre uma linha de investigação que poderia, talvez, permitir melhor definição do mecanismo de ação da ouabaína sobre o ciclo de vesículas sinápticas. Além disso, a compreensão sobre o mecanismo de ação da ouabaína ganha uma dimensão muito maior na medida em que compostos endógenos de estrutura idêntica à ouabaína foram isolados em tecidos de mamíferos (Hamlyn *et al.*, 1991; Scheneider *et al.*, 1998; Boulanger *et al.*, 1993), levantando a possibilidade de atuação desses compostos em mecanismos fisiológicos.

6 - Conclusão

A ouabaína promove liberação de vesículas sinápticas em junção neuromuscular de rã independentemente do cálcio extracelular, mas requer a presença de íons sódio no meio para que seu efeito como secretagogo seja observado. Isto chama a atenção para a possibilidade de recrutamento de estoques intracelulares de cálcio na exocitose evocada por este derivado esteróide. Além de promover liberação vesicular, a ouabaína inibe a endocitose compensatória de forma duradoura e por mecanismo distinto da acidificação do terminal pré-sináptico. Diante desses achados, este glicosídeo se apresenta como uma importante ferramenta farmacológica para estudo do ciclo sináptico, principalmente em experimentos em que se deseja a separação dos passos de exocitose e endocitose. Os dados apresentados neste trabalho podem futuramente nortear abordagens celulares e moleculares que esclareçam como as alterações iônicas desencadeadas pela ouabaína interferem com a maquinaria protéica que regula o tráfego de vesículas sinápticas.

7 – Referências Bibliográficas

ADAM-VIZI, V. External Ca(2+)-independent release of neurotransmitters. **Journal of Neurochemistry**, v. 58, n. 2, p. 395-405, fev. 1992.

ADAM-VIZI, V.; DERI, Z.; BORS, P; TRETTER, L. Lack of involvement of [Ca²⁺]_i in the external Ca(2+)-independent release of acetylcholine evoked by veratridine, ouabain and alpha-latrotoxin: possible role of [Na⁺]_i. **The Journal of Physiology Paris**, v. 87, n.1, p. 43-50, 1993.

AIZMAN, O.; ULHEN, P.; LAL, M.; BRISMAR, H.; ASPERIA, A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 23, p. 13420-24, nov. 2001.

BAKER, P. F.; CROWFORD, A. C. A note of the mechanism by which inhibitors of the sodium pump accelerate spontaneous release of transmitter from motor nerve terminals. **The Journal of Physiology**, v. 247, n. 1, p. 209-226, maio de 1975.

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

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

BIRKS, R. I. The effects of a cardiac glycoside on subcellular structures within nerve cells and their processes in sympathetic ganglia and skeletal muscle. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 40, p. 303-15, 1962.

BIRKS, R. I.; COHEN, M. W.; The action of sodium pumps inhibitors on neuromuscular transmission. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**, vol. 170, n. 21, p. 381-99, 1968.

BOULANGER, B. R.; LILLY, M. P.; HAMLYN, J. M.; LAREDO, J.; SHURTLEFF, D.; GANN, D. S. Ouabain is secreted by the adrenal gland in awake dogs. **The American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 264, n. 3, p. 413-419, 1993.

BRAVO, Dawn; PARSONS, Stanley M. Microscopic kinetics and structure-function analysis in the vesicular acetylcholine transporter. **Neurochemistry International**, v. 41, p. 285-289, nov. 2002.

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

BURNS, Marie E.; AUGUSTINE, George J. Synaptic Structure and Function: Dynamic Organization Yields Architectural Precision. **Cell**, v. 83, p. 187-194, out. 1995.

CASALI, T. A.; GOMEZ, R. S.; MORAES-SANTOS, T.; GOMEZ, M.V. Differential effects of calcium channel antagonists on tityustoxin and ouabain-induced release of [3H]acetylcholine from brain cortical slices. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 6, p. 599-603, jun. 1995.

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

DESAKI, J.; UEHARA, Y. The overall morphology of neuromuscular junction as revealed by scanning electron microscopy. **Journal of Neurocytology**, v. 10, n. 1, p. 101-110, fev. 1981.

FUJINO, M.; FUJINO, S. An immunohistochemical study of the significance of a new 31,5-KD ouabain receptor protein isolated from cat cardiac muscle. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 67, p. 125-135, 1995.

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

GOMEZ, M. V.; DINIZ, C. R.; BARBOSA, T. S. A comparison of the effects of scorpion venom tityustoxin and ouabain on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 24, n. 2, p. 331-336, fev. 1975.

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

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

HALL, Z. W. **An Introduction to Molecular Neurobiology**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 1992.

HALL, Z. W.; SANES, J. R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. **Cell/Neuron**, suplemento 72/10, p. 99-121, jan. 1993.

HAMLYN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P.; BOVA, S.; DU CHARME, D. W.; HARRIS, D. W.; MANDEL, F.; MATHEWS, W. R.; LUDENS, J. H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, 6259-63, 1991.

HAMLIN, J. M.; LAREDO, J.; SHAH, J. R.; LU, Z. R.; HAMILTON, B. P. 11-Hydroxylation in the biosynthesis of endogenous ouabain: Multiple implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, p. 685-93, 2003.

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

KATZ, Bernard. **Nerve, Muscle and Synapse**. McGraw-Hill Book Company. 1966. 193p.

KAWAMURA, A.; ABRELL, L. M.; MAGGIALI, F.; BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; LABUTTI, J.; MAGIL, S.; HAUPERT, G. T. Jr.; HAMLIN, J. M. Biological implication of conformational flexibility in ouabain: observations with two ouabain phosphate isomers. **Biochemistry**, v. 40, n. 19, p. 5835-44, 2001.

LICHTMAN, J. W.; WILKINSON, R. S.; RICH, M. M. Multiple innervation of tonic endplates revealed by activity-dependent uptake of fluorescent probes. **Nature**, v. 314, n. 6009, p. 357-9, mar. 1985.

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

LOMEO, R. S.; GOMEZ, R. S.; PRADO, M. A.; ROMANO-SILVA, M. A.; MASSENSINI, A. R.; GOMEZ, M. V. Exocytotic release of [3H]-acetylcholine by ouabain involves intracellular Ca²⁺ stores in rat brain cortical slices. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, n. 6, p. 917-27, dez. 2003.

LONGENECKER, H. E. Jr.; HULBURT, W. P.; MAURO, A.; CLARK, A. W. Effects of black widow spider venom on the frog neuromuscular junction. Effects on end-plate potential, miniature end-plate potential and nerve terminal spike. **Nature**, v. 225, n. 5234, p. 701-703, fev. 1970.

MCFADDEN, S. C.; BOBICH, J. A.; ZHENG, Q. Double-labeled preparation for simultaneous measurement of [3H]-noradrenaline and [14C]-glutamic acid exocytosis from streptolysin-O (SLO)-perforated synaptosomes. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 107, n. 1-2, p. 39-46, maio de 2001.

MEUNIER, F. A.; COLASANTE, C.; MOLGO, J. Sodium-dependent increase in quantal secretion induced by brevetoxin-3 in Ca²⁺-free medium is associated with depletion of synaptic vesicles and swelling of motor nerve terminals in situ. **Neuroscience**, v. 78, n. 3, p. 883-93, jun. 1997.

MOLGÓ, J.; PECOT-DECHAVASSINE, M. Effects of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone on quantal transmitter release and ultrastructure of frog motor nerve terminals. **Neuroscience**, v. 24, n. 2, p.695-708, 1988.

MURTHY, N. Venkatesh; DE CAMILLI, Pietro. Cell Biology of the Presynaptic Terminal. **Annual Review of Neuroscience**, v. 26, p. 701-728, 2003.

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

NORDMANN, J. J.; STUENKEL, E. L. Ca⁽²⁺⁾-independent regulation of neurosecretion by intracellular Na⁺. **FEBS Letters**, v. 292, n. 1-2, p. 37-41, nov. 1991.

NORDMANN, J. J.; LINDAU, M.; STUENKEL, E. L. Sodium, calcium and exocytosis: confessions of calcified scientists. **The Journal of Physiology Paris**, v. 86, p. 15-21, 1992.

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

PRADO, M. A., GOMEZ, M. V.; COLLIER, B. Mobilization of a vesamicol-insensitive pool of acetylcholine from a sympathetic ganglion by ouabain. **The Journal of Neurochemistry**, v. 61. n. 1, p. 45-56. 1993.

PRADO, Marco Antônio M.; REIS, Ricardo A. M.; PRADO, V. F.; MELLO, Maria Christina de; GOMEZ, Marcus V.; MELLO, Fernando G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, v. 41, p. 291-299, nov. 2002.

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

RIBCHESTER, RR.; MAO F.; BETZ, W. J. Optical measurements of activity-dependent membrane recycling in motor nerve terminals of mammalian skeletal muscle. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 255, n. 1342, p. 61-66, jan. 1994.

RIBEIRO, Fabíola M.; BLACK, Stefanie A. G.; PRADO, Vânia F.; RYLETT, R. Jane; FERGUSON, Stephen S. G.; PRADO, Marco Antônio Máximo Prado. The “ins” and “outs” of the high-affinity choline transporter CHT1. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 1-12, abr. de 2006.

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

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

RIZZOLI, Silvio O.; BETZ, William J. Synaptic Vesicle Pools. **Nature Reviews/Neuroscience**, v. 6, p. 57-69, jan. 2005.

ROBITAILLE, R.; ADLER, E. M.; CHARLTON, M. P. Strategic localization of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. **Neuron**, v. 5, p. 773-779, dez. 1990.

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

SANES, Joshua R.; LICHTMAN, Jeff W. Induction, Assembly, Maturation and Maintenance of a Postsynaptic Apparatus. **Nature Reviews/Neuroscience**, v. 2, p. 791-805, nov. 2001.

SCHENEIDER, Ralf; VICTOR, W.; NIMTZ, M.; LEHMANNPAR, W. D.; KIRCH, U.; ANTOLOVI C, R.; SCHONER, W. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 2, p. 784-92, 1998.

STROBRAWA, Sandra M.; BREIDERHOFF, Tilman; TAKAMORI, S.; ENGEL, D.; MICHAELA, S.; ZDEBIK, A. A.; BOSI, M. R.; REUTHER, K.; JAHN, H.; DRAUGHN A.; JAHN, R.; JENTSCH, T. Disruption of ClC-3, a Chloride Channel Expressed on Synaptic Vesicles, Leads to a Loss of the Hippocampus. **Neuron**, v.29, p. 185-196. jan. 2001.

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

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

TSANG, C. W.; ELRICK, D. B.; CHARLTON, M. P. α -Latrotoxina releases calcium in frog motor nerve terminals. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 23, p. 8685-8692, dez. 2001.

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

VIZI, E. S. Stimulation, by inhibition of (Na⁺ + K⁺ + Mg²⁺)-activated ATP-ase, of acetylcholine release in cortical slices from rat brain. **The Journal of Physiology**, v. 226, n.1, p. 95-117, out. 1972.

VON GERSDORFF, H.; MATTHEWS, G. Inhibition of endocytosis by elevated internal calcium in synaptic terminals. **Nature**, v. 370, p. 652-655, 1994.

WU, L. G.; BETZ, W. J. Nerve activity but not intracellular calcium determines the time course of endocytosis at the frog neuromuscular junction. **Neuron**, v.17, p. 769-779, out. 1996.

YANG, Feng; HE, Xiang-Ping; RUSSEL, James; LU, Bai. Ca²⁺ influx-independent synaptic potentiation mediated by mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger and protein kinase C. **The Journal of Cell Biology**, v. 163, n. 3, nov. 2003.

ZHAI, R. Grace; BELLEN, Hugo J. The Architecture of the Active Zone in the Presynaptic Nerve Terminal. **Physiology**, vol. 19, p. 262-270, out. 2004.

ZHONG, Ning; BEAUMONT, Vahri; ZUCKER, Robert. Roles for mitochondrial and reverse mode Na⁺-Ca²⁺ exchange and the plasmalema Ca²⁺ ATPase in post-tetanic potentiation at crayfish neuromuscular junctions. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 24, p. 9598-9607, dez. 2001.