Medicina, Ribeirão Preto,
32: 167-188, abr./jun. 1999

ASPECTOS MOLECULARES DA TRANSMISSÃO SINÁPTICA*

MOLECULAR ASPECTS OF SYNAPTIC TRANSMISSION

Ana C. Polli Lopes[2], Luciana Casaletti Rosa[1], René de O. Beleboni[3], Rodrigo N. R. Pereira[4], Carlos A. C. de Vasconcelos[2] & Jorge E. Moreira[5].

[1,2,3,4] Alunos de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) nos Departamentos de Morfologia[1], Patologia[2], Bioquímica[3] e Fisiologia[4]. [5]Professor do curso de pós-graduação, RMF 5751, "Aspectos Moleculares da Transmissão Sináptica"- Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP).
Correspondência: Prof. Dr. Jorge E. Moreira – Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da USP – CEP:14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil. e-mail: cello@fmrp.usp.br

POLLI LOPES AC; CASALETTI ROSA L; BELEBONI RO; PEREIRA RNR; VASCONCELOS CAC & MOREIRA JE. Aspectos moleculares da transmissão sináptica. **Medicina,** Ribeirão Preto, 32: 167-188, abr./jun. 1999.

RESUMO: O Sistema Nervoso Central produz o nosso estado consciente mediante um contínuo fluxo de informações e armazenamento de memórias ao longo da vida, a partir de diferentes estímulos externos. Ao mesmo tempo, controla a concentração dos nossos fluidos internos e o trabalho de músculos e glândulas. A transmissão sináptica é o processo básico de toda esta atividade. Bilhões de neurônios se comunicam entre si via milhares de sinapses, e cada sinapse, por sua vez, é uma estrutura regulada independentemente. A partir desta complexidade, em lugar de caos, surge uma singular ordem na informação processada pelo cérebro. A secreção de neurotransmissores na zona ativa da sinapse é o evento primário da comunicação interneuronal. Este processo é regulado por um tráfego de membranas altamente orquestrado dentro do terminal pré-sináptico. Os neurotransmissores são armazenados em vesículas sinápticas. A despolarização de um terminal nervoso por um potencial de ação resulta na abertura de canais de cálcio, operados por voltagem. O influxo de Ca^{2+} resultante deflagra a exocitose, que é uma rápida fusão de vesículas com a membrana plasmática, liberando neurotransmissores para a fenda sináptica. A exocitose envolve a junção de proteínas intrínsecas das membranas plasmáticas, vesicular e pré-sináptica, mediante proteínas específicas de ancoragem e fusão na zona ativa (SNARE). Em seguida à liberação, as membranas das vesículas são rapidamente reincorporadas via endocitose e recicladas dentro do terminal sináptico. O terminal é, portanto, uma unidade autônoma que contém todos os elementos requeridos para a exocitose das vesículas, as proteínas responsáveis pela biossíntese do neurotransmissor e recaptação das vesículas. Uma vez liberado, o neurotransmissor difunde através da fenda sináptica e interage com proteínas receptoras na membrana do neurônio pós-sináptico produzindo, em uma fração de milissegundo, uma permeabilidade intensa e temporária aos íons Na^+ e K^+, provocando a despolarização total de cerca de 100 mV desde um potencial de repouso em torno de -60mV. Isto gera um potencial de ação que se difunde ao longo da membrana do neurônio pós-sináptico, podendo alcançar o seu próprio terminal e deflagrar novo movimento de Ca^{2+} para o citosol, gerando um novo potencial. Várias proteínas dentro do terminal pós-sináptico estão envolvidas neste processo. É geralmente aceito que os processos de aprendizado e memória resultam de mudanças estruturais e bioquímicas em sinapses específicas que alteram a liberação de neurotransmissores e a ação pós-sináptica. Tais alterações podem ser registradas eletrofisiologicamente como uma potenciação ou depressão de duração longa (LTP ou LTD) ou a combinação de ambas.

UNITERMOS: Sinapse. Vesículas Sinápticas. Transmissão Sináptica. Potenciação de Longo Prazo.

**Resultados de seminários e discussões realizados durante o curso RMF 5751, entre 31 de agosto e 30 de setembro de 1998.*

"O que o cérebro faz o tempo todo, dormindo ou acordado, é criar imagens. Luz nada mais é do que radiação eletromagnética. Cores não existem fora de nossa mente. Nem os sons. O som é o produto da relação entre uma vibração externa e o cérebro. Se não existisse cérebro, não haveria som, nem cores, nem luz, nem escuridão."

Rodolfo Llinás [1]

INTRODUÇÃO

O sistema nervoso produz e regula todos os aspectos das funções do corpo humano e a sua complexidade parece infinita. Bilhões de neurônios agrupados para diferentes funções checam, constantemente, o meio interno da nossa anatomia e o universo exterior: luz, tato, pressão, som, equilíbrio, imagens, concentrações de muitas substâncias, dor, emoção, consciência.

Grupos de neurônios interagem e transmitem a informação resultante a outros grupos para que ela seja processada e armazenada. Mediante o mesmo processo, outros neurônios regulam a contração dos músculos e a secreção das glândulas endócrinas e exócrinas. O cérebro, o centro de controle que armazena, computa, integra e transmite a informação, contém ao redor de 10^{11} neurônios e cada um deles forma conexões, chamadas sinapses, com até duzentos mil (200.000) outros neurônios[2].

Um simples neurônio pode ser afetado, simultaneamente, por estímulos excitatórios e inibitórios de axônios provenientes de muitos neurônios. Os diferentes sinais diminuem ou aumentam o potencial que se movimenta ao longo da membrana plasmática, a partir do ponto de sinapse para o corpo celular, e daí para o cone axonal. A partir daí, um novo potencial de ação será gerado ou não, dependendo do balanço de tempo, amplitude, e localização dos vários potenciais excitatórios e inibitórios, recebidos pelo neurônio. Os potenciais de ação são gerados quando a magnitude do potencial de membrana do cone axonal diminui até o limiar de excitação.

De certo modo, cada neurônio é um computador individual, que tira uma média de todos os distúrbios elétricos que recebe através de sinapses de outros neurônios, e faz a decisão de disparar um potencial de ação e conduzi-lo até o terminal axonal ou não.

Muitos dos sistemas nervosos de maior interesse, como o cérebro dos mamíferos, são demasiado complexos para serem estudados em neurônios individuais ou em pequenos grupos que cumprem uma determinada função. Por exemplo, num fragmento do tamanho de um grão de arroz de córtex cerebral, de qualquer mamífero, como o homem, poderíamos encontrar um (01) milhão de neurônios, e, portanto, um (01) bilhão de sinapses e talvez uns 30 km de fios (axônios) fazendo as interconexões. Nesse sistema, seria, então, bastante difícil observar um único neurônio, injetá-lo ou estimulá-lo para estudar a sua resposta pós-sináptica (Figura 1).

Uma grande quantidade de informação tem sido obtida de sistemas nervosos mais simples. Por exemplo, lulas, caracóis-de-mar e nemátodos contêm poucos neurônios, grandes, relativamente fáceis de serem identificados e manipulados experimentalmente. Nessas espécies, alguns neurônios podem estar envolvidos numa tarefa específica que pode ser estudada com certo detalhe[3](Figuras 2 e 3).

A maior parte do conhecimento atual sobre o sistema nervoso tem sido obtida a partir de estudos nesses invertebrados. Os princípios envolvidos no funcionamento são gerais e aplicáveis a sistemas nervosos mais complexos, como o dos humanos.

A natureza e mecanismos que caracterizam a comunicação química entre neurônios, chamada de transmissão sináptica, têm sido estudados, principalmente, durante os últimos trinta anos. A maior parte do sucesso obtido em tal área foi mediante estudos da sinapse gigante da lula *Loligo pealii*. Esses estudos têm sido úteis para definir o processo temporal, medido em frações de milissegundo (ms) e o processo espacial, medido em nanômetros.

A transmissão química envolve dois tipos distintos de especializações neuronais, os compartimentos pré- e pós-sinápticos. A liberação de neurotransmissor (NT) desde o seu sítio intracelular no terminal pré-sináptico e a resposta a tal NT ocorre em estruturas pós-sinápticas através do espaço intersináptico ou fenda sináptica (FS).

Atualmente, os receptores pós-sinápticos são caracterizados até o nível das subunidades moleculares que os compõem[4]. Por outro lado, boa parte dos mecanismos de liberação pré-sináptica dos neurotransmissores é desconhecida. Blocos de conhecimento faltam nos campos biofísico, biomolecular e celular.

As questões a serem respondidas referem-se a quatro áreas principais: 1) o mecanismo de liberação dos neurotransmissores; 2) o papel do cálcio (Ca^{2+}) em tal processo; 3) o papel dos moduladores químicos

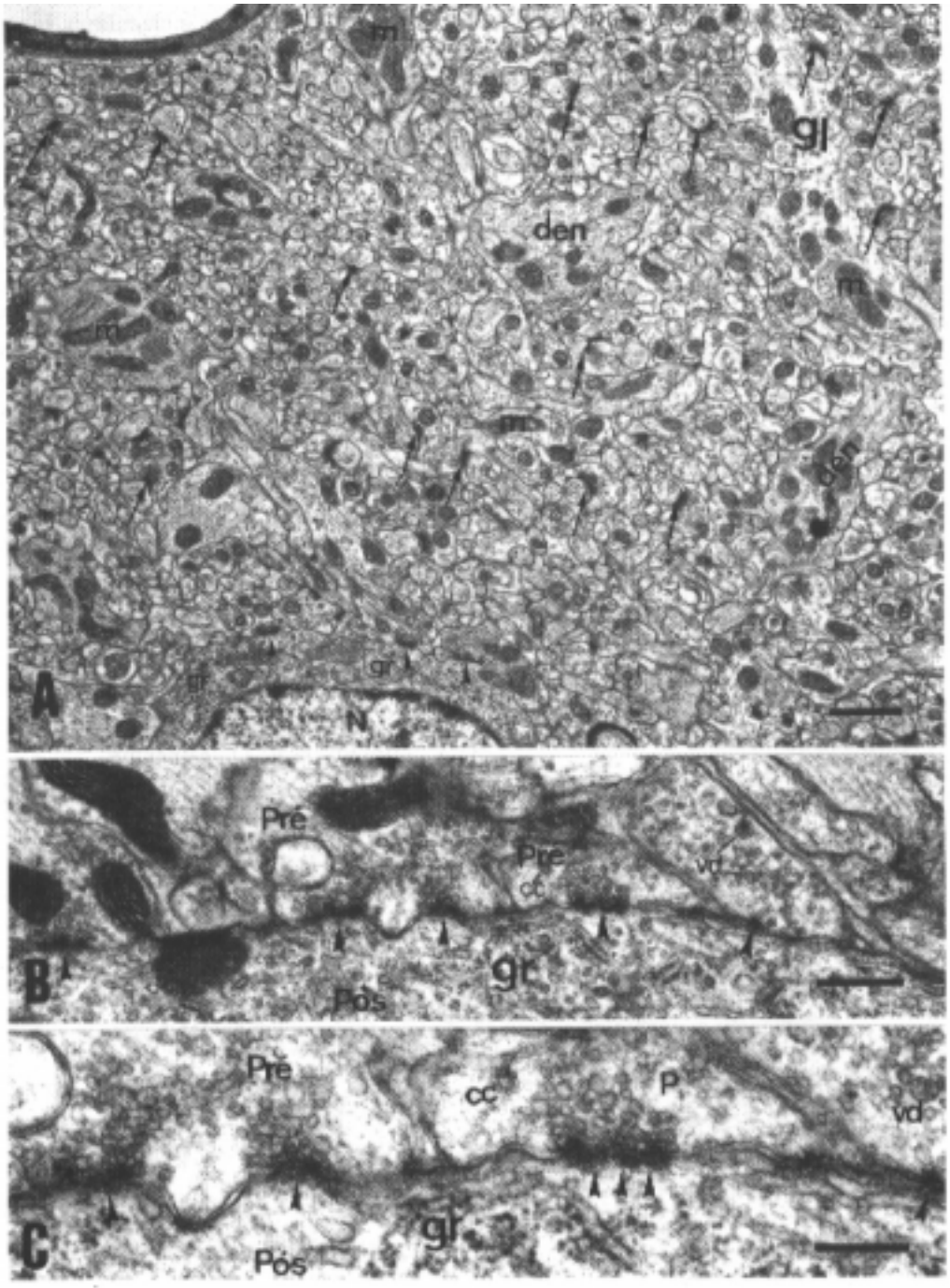

Figura 1 - *Eletromicrografias de cerebelo (camundongo C57-BL). Em A, a enorme complexidade do neurópilo dos mamíferos mostra oitocentos e setenta e nove (879) botões terminais com as suas correspondentes espinhas dendríticas, numa superfície inferior a 100μ^2. As setas apontam algumas das densidades sinápticas visíveis. Em cada sinapse, podem ser observadas as áreas pré e pós-sinápticas, pela presença ou não de vesículas, mas seria difícil apontá-las individualmente. Uma parte da micrografia é ocupada por um capilar (C), processos gliais como em gl, processos dendríticos (den) e parte do citoplasma de um neurônio granular (gr), recebendo contatos sinápticos de terminais axonais no neurópilo (pontas de setas). Em B e C, detalhe dos contatos sinápticos sobre o neurônio granular. Sinapses inibitórias (densidades simétricas e vesículas pleomórficas) mostram aglomerados de vesículas sinápticas pequenas (P), várias delas ancoradas ou em fusão com a membrana pré-sináptica, na zona ativa. Em um dos terminais há uma vesícula coberta, cc, e, em outro, vesículas grandes de corpo denso, vd. Pré, pré-sináptico; Pós, pós-sináptico; N, núcleo; m, mitocôndria. As barras indicam 1, 0,5 e 0,25 µm respectivamente em A, B e C. (Cerebelo fixado por perfusão intravascular, incluído em resina plástica e seccionado a ~70nm. Morfometria feita sobre a micrografia com uma tabuleta digital Zidas em interface com um computador Macintosh G-3; J.E.Moreira, micrografias inéditas).*

na atividade desses neurotransmissores, e 4) aspectos da plasticidade sináptica. As três primeiras questões estão entrelaçadas a tal ponto que é difícil estabelecer uma separação clara entre elas. No entanto, tem sido conhecido, por longo tempo, que o fenômeno da liberação do NT depende da entrada de Ca^{2+} no citosol e de que o Ca^{2+} é o principal iniciador do processo de secreção[5].

Trabalhos recentes têm confirmado essa hipótese, mostrando que o influxo de Ca^{2+}, dada a rapidez da transmissão sináptica, deve ser produzido por uma maquinaria celular altamente estruturada, capaz de causar um fenômeno que pode ser medido em fração de ms[4].

Aspectos da plasticidade sináptica são discutidos à luz de controversas hipóteses que procuram relacionar potenciações e depressões de longa duração com os processos de memória e aprendizado.

Com base em toda essa informação, torna-se evidente a importância do trabalho colaborativo entre morfologistas, biólogos moleculares, bioquímicos, farmacólogos e eletrofisiólogos.

O problema básico é compreender como o potencial de ação de um nervo se transforma num processo de secreção que leva à transmissão sináptica.

SINAPSES

Como mencionamos antes, sinapses são pontos de comunicação pelos quais os neurônios pré-sinápticos, mediante os seus axônios, passam sinais para pontos alvos pós-sinápticos, que podem ser os dendritos, o axônio ou o corpo celular de outro neurônio, células musculares ou células glandulares.

Há dois tipos de sinapse, elétricas e químicas, que diferem em estrutura e função.

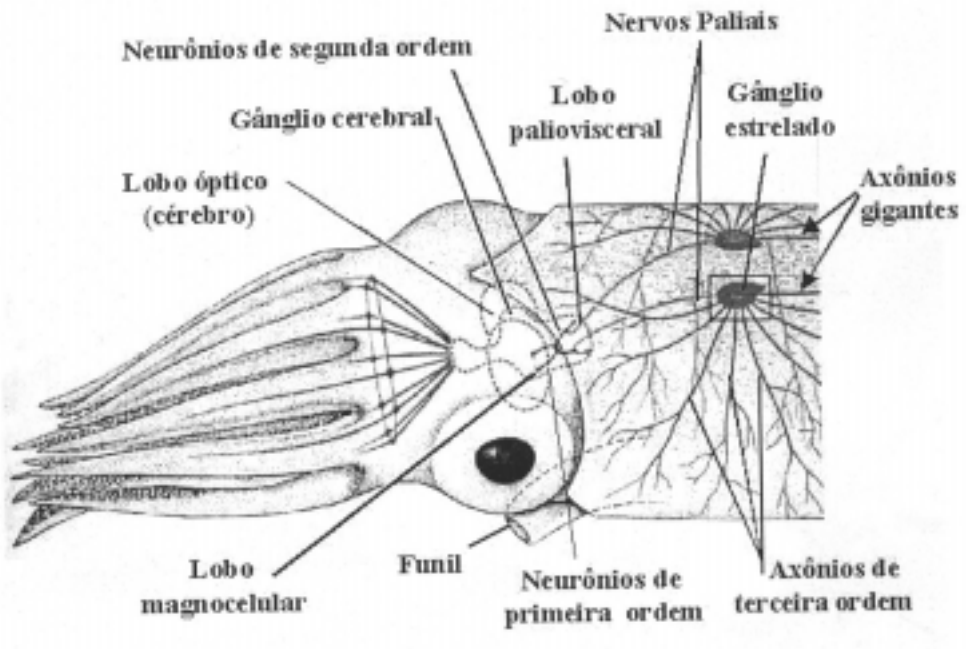

Figura 2 - *Diagrama do sistema nervoso da lula Loligo pealii (modificado de Llinás & Sugimori, 1988; [3]). Um par de neurônios de primeira ordem recebe impulsos sinápticos de ambos os lados do cérebro e se fusiona pelos seus axônios que cruzam na linha média, na altura do lobo paliovisceral. Depois do ponto de fusão axoplásmica, sinapses químicas e eletrotônicas são estabelecidas com vários axônios gigantes de neurônios de segunda ordem, dentro do mesmo lobo. Axônios dos dois maiores neurônios de segunda ordem formam os elementos pré-sinápticos das sinapses gigantes com axônios gigantes de terceira ordem, no gânglio estrelado. O dígito mais distal, em cada gânglio, forma a maior das sinapses e dá origem aos axônios gigantes, que percorrem, caudalmente, todo o comprimento do manto muscular e alcançam até 0,5 mm de espessura (setas). As sinapses gigantes são motoras, acionando a atividade do manto, do sifão, e do jato de tinta no reflexo de fuga. A maior parte do conhecimento atual sobre o funcionamento do sistema nervoso dos animais superiores foi obtida de experimentos realizados nesta espécie. O tamanho dos neurônios e das sinapses permite diferentes tipos de manipulações experimentais, como injeções intra-sinápticas e observação do transporte axonal.*

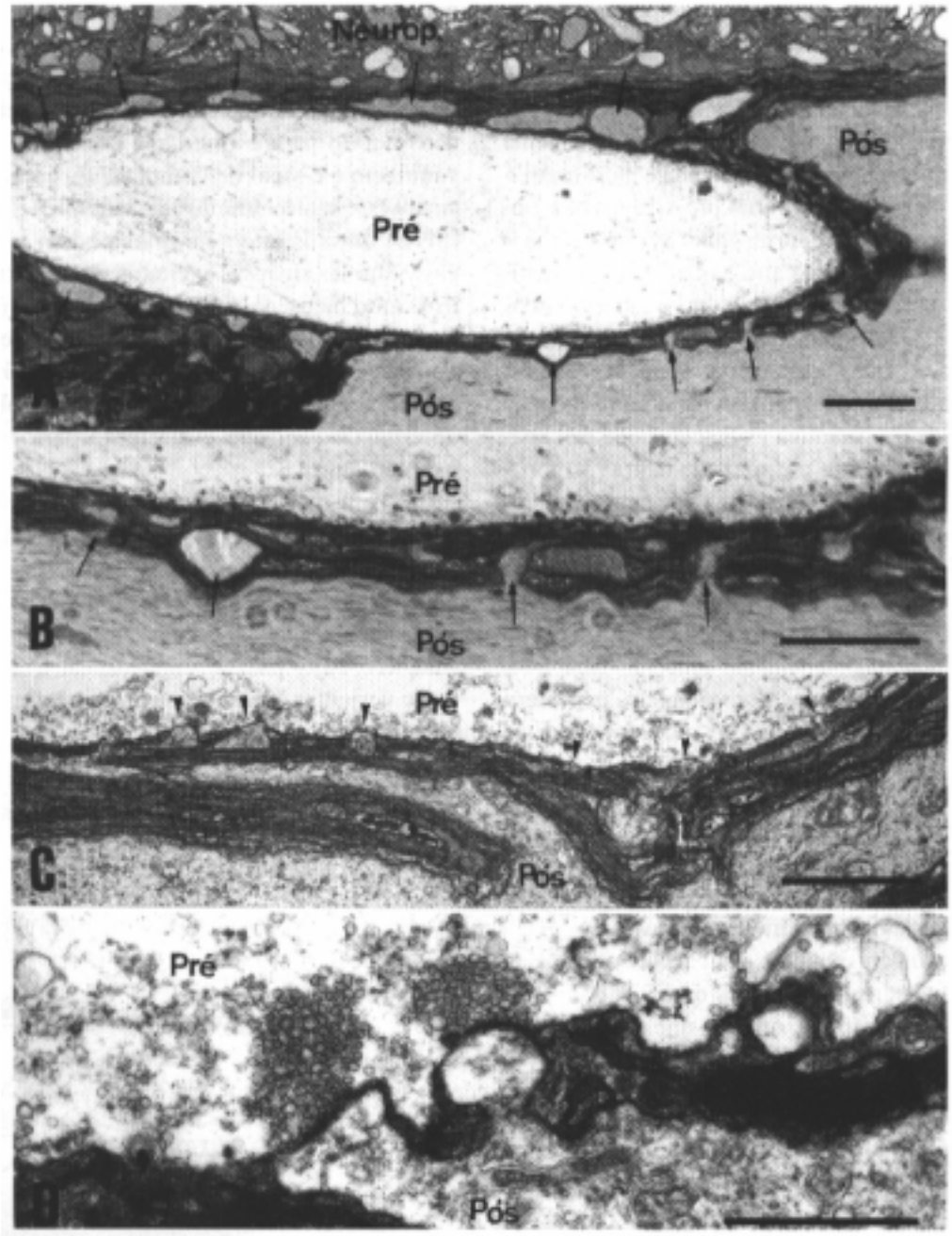

Figura 3 - *Gânglio estrelado da lula* Loligo pealii, *A e B, fotomicrografias, C e D, eletromicrografias. A simplicidade deste sistema pode ser apreciada na microscopia de luz. Em A, notar que o neurópilo (Neurop.) possui muitos terminais pré e pós-sinápticos, como no cerebelo dos mamíferos, mas estes são muito maiores. Os terminais pré-sinápticos são mais claros que os pós-sinápticos. Secção transversal da sinapse gigante mostra a interação entre o terminal pré-sináptico (Pré), e o pós-sináptico (Pós) que dará origem ao axônio gigante da lula. Nas áreas de contato, o pós-sináptico envia processos digitiformes que formam zonas ativas nos limites de interação com as vesículas do lado pré-sináptico (setas). Em B, maior detalhe dos limites pré-e pós-sinápticos. A microscopia de luz não consegue resolver as densidades e vesículas sinápticas. Em C, eletromicrografia de baixo aumento; densidades sinápticas e grupos de vesículas podem ser observados (cabeças de setas). Em D, duas densidades sinápticas mostram aglomerados de vesículas sinápticas em correspondência das zonas ativas. As barras indicam 10µm em A e B; 5µm em C; e 1µm em D. (O gânglio estrelado foi fixado por perfusão intravascular do fixador diluído em água de mar, incluído em resina plástica e seccionado a 0,5µm para a microscopia de luz e a ~70nm para a microscopia eletrônica; J.E.Moreira, micrografias inéditas).*

Os neurônios que se comunicam mediante sinapses elétricas são conectados por junções comunicantes (gap junction) através das quais os impulsos elétricos passam diretamente da célula pré-sináptica à pós-sináptica. A vantagem das sinapses elétricas é a velocidade, já que o impulso direto evita a demora ao redor de 0,5 ms, característica das sinapses químicas.

A sinapse química, base funcional do sistema nervoso, é uma estrutura especializada e auto-regulada. É integrada por um terminal pré-sináptico, o botão terminal, e uma área correspondente do neurônio pós-sináptico, que contém parte da densidade sináptica, receptores para neurotransmissores e canais iônicos pós-sinápticos. O terminal pré-sináptico contém as vesículas sinápticas, que carream neurotransmissores específicos, e a membrana com os canais pré-sinápticos. Cada vesícula sináptica (VS) consta de um aparelho protéico, formado por mais de trinta (30) proteínas específicas para produzir fusão de suas membranas com a membrana pré-sináptica e secretar o NT. Imediata endocitose é produzida para reciclar a membrana e os componentes não utilizados do NT[6,7]. A fusão é um processo muito rápido, medido em fração de ms, produzido pelo potencial de ação pré-sináptico, quando os canais, operados por voltagem, permitem rápida e passageira entrada de Ca^{2+} no terminal. Este cálcio interage com várias das proteínas da membrana vesicular[8,9,10]. Acredita-se que cada VS, no terminal, contém somente um tipo de NT (Tabela I), mas um mesmo terminal axonal pode conter dois ou mais tipos de vesículas com diferentes neurotransmissores. Para efetuar o sinal, o NT difunde desde o terminal, através da FS, para a célula pós-sináptica, onde se une a receptores específicos na sua membrana, causando uma mudança na permeabilidade a certos íons.

As sinapses podem ser excitatórias ou inibitórias. Nas excitatórias, o neurotransmissor liberado pela célula pré-sináptica produz uma mudança localizada na membrana da célula pós-sináptica que a leva a se despolarizar, promovendo a geração de um potencial elétrico. Nas sinapses inibitórias, a união do NT causa uma mudança na permeabilidade de íons, que tende a bloquear o potencial da célula pós-sináptica por hiperpolarização de suas membranas.

As sinapses químicas possuem duas principais vantagens sobre as elétricas. Primeiro, a amplificação do sinal, o que é comum em sinapses (junções) neuromusculares. Um potencial de ação de somente um neurônio motor pode causar contração de múltiplas células musculares, porque a liberação de relativamente poucas moléculas de NT, na sinapse, é todo o requerido para estimular a contração. A segunda vantagem é o sinal de computação, comum em cada sinapse de interneurônios no sistema nervoso central (SNC). Muitos interneurônios podem receber sinais em múltiplas sinapses excitatórias e inibitórias. Algumas mudanças na permeabilidade de íons duram menos de um ms, outras duram vários segundos (s). Se um potencial é gerado ou não, depende de uma complexa função de todos os sinais recebidos, o sinal de computação, que é diferente para cada tipo de interneurônio.

Esta revisão está dedicada exclusivamente às sinapses químicas, por serem as mais abundantes e significativas do sistema nervoso (SN), e, portanto, as mais estudadas. Dentro deste tópico, a ênfase serão os processos de exo e endocitose, no terminal pré-sináptico, cujos passos principais são a ancoragem e a fusão vesicular à membrana pré-sináptica para a liberação do NT.

Tabela I - Substâncias com propriedades neurotransmissoras ou neuromoduladoras

Catecolaminas	Adenosina
Dopamina (DA)	Adenosina trifosfato (ATP)
Norepinefrina (NE)	**Neuropeptídeos**
Epinefrina	Encefalinas
Indolaminas	β-endorfinas
Serotonina (5-HT)	Dinorfina
Triptamina	Vasopressina
Melatonina	Ocitocina
Dimetil-triptamina	Substância P
Colinérgicos	Colecistocinina
Acetilcolina (ACh)	Neurotensina
Colina	Peptídeo Vasoativo Intestinal (PVI)
Aminoácidos e nucleotídeos	Somatostatina
Glutamato	Neuropeptídeo Y
Aspartato	Galanina
Glicina	**Hormônios não-peptídicos**
Histamina	Estrógenos
Ácido γ-aminobutírico(GABA)	Andrógenos
γ-hidroxibutirato (GHB)	Corticosteróides
Taurina	Hormônios da tireóide

O COMPLEXO PRÉ-SINÁPTICO

Biogênese da vesícula sináptica

A biogênese da VS diverge da secreção constitutiva[8,11,12,13]. As proteínas constituintes da membrana vesicular sináptica são sintetizadas no Retículo Endoplasmático Granular (REG) e carreadas em vesículas do Complexo de Golgi para o terminal pré-sináptico, mediante proteínas motoras (kinesina e dineína citoplasmática) ao longo de microtúbulos[9], ou miosinas ao longo de filamentos de actina[14]. Uma vez fundidas à membrana pré-sináptica, são internalizadas com outros marcadores de endocitose mediada por receptor. As proteínas da membrana vesicular, provavelmente selecionadas no endossoma primário, originarão as VS que, posteriormente, serão preenchidas com NT[15] (Tabela I). Esse processo é realizado por um complexo constituído de transportadores protéicos[10] e de uma bomba de prótons[16] que gera um ambiente luminal ácido no interior da vesícula, e um gradiente eletroquímico adequado. A entrada do NT ocorre em função da diferença de pH entre o interior da vesícula e o citosol. Algumas proteínas, como a sinapsina e a Rab3A, são produzidas nos polissomas e adicionadas ao REG, no terminal sináptico (Figura 4).

O tamanho das VS varia, dependendo do tipo de NT contido no seu interior[17]. Existem dois tipos de vesículas: as de centro denso (VCD) e as pequenas de centro claro (VP). As VCD apresentam uma região central elétron-densa e são subdivididas em dois tipos: pequenas (PVCD), 80 nm, que contêm catecolaminas, e grandes (GVCD), 200 nm, que contêm neuropeptídeos. As VP são elétron-lúcidas, diâmetro de 50 nm e contém um tipo de NT de ação rápida que pode ser acetilcolina, glicina, GABA ou glutamato. Estas vesículas não estão distribuídas uniformemente no citoplasma pré-sináptico, estando, a maioria, reunida a uma distância de aproximadamente 0,5 μm da membrana, próximo à zona ativa. Tal distância é mantida

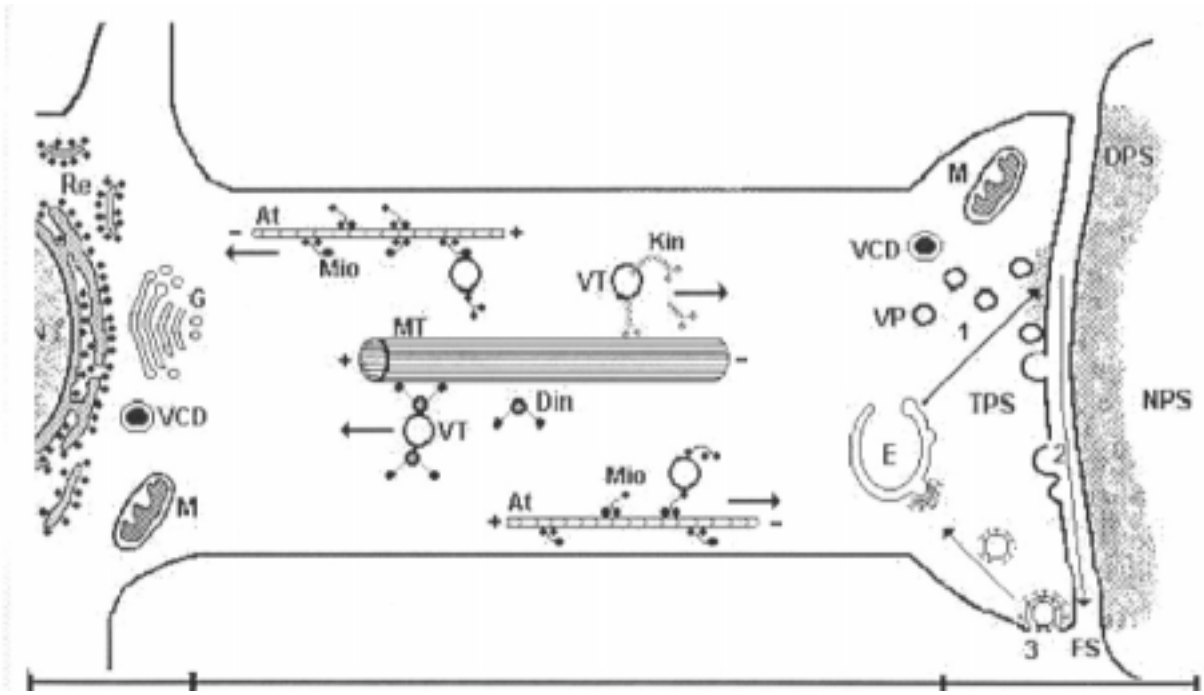

Figura 4 - *Representação esquemática dos processos de transporte e biogênese da vesícula sináptica (VP). Em A, síntese protéica no pericário; B, transportes axonal anterógrado e retrógrado e C, processos de exo e endocitose no terminal pré-sináptico (TPS) e neurônio pós-sináptico (NPS). O transporte axoplasmático anterógrado de vesículas (VT) é realizado, principalmente, por kinesinas (Kin) e miosinas (Mio) associadas a microtúbulos (MT) e filamentos de actina (At), respectivamente. O transporte retrógrado utiliza dineína citoplasmática (Din) e, possivelmente, miosina associada a filamentos de actina, orientados no sentido retrógrado. N, núcleo; Re, Retículo endoplasmático granular; G, Golgi; M, mitocôndria; VCD, vesícula grande de centro denso; VP, vesícula pequena de centro claro; E, endossoma; FS, fenda sináptica; DPS, densidade pós-sináptica. (Figura original dos Autores).*

por um balanço entre forças de atração (van der Waals) e de repulsão (eletrostática e de hidratação). A hidratação é a principal força que determina a distância com a membrana, e o íntimo contato só é possível com a abolição desta força[18]. O conjunto de vesículas é reciclado continuamente[19;20] e mantido por elementos do citoesqueleto, próximo à membrana pré-sináptica.

Quando um potencial de ação alcança o terminal, é esperado que, pelo menos, alguma vesícula se fusione com a membrana pré-sináptica. Vesículas em contato com a região especializada da membrana são definidas como "docked" (ancoradas), e algumas delas completarão a fusão[21]. Após a fusão, a membrana da vesícula torna-se parte da membrana pré-sináptica, sendo endocitada para reutilização (Figuras 4 e 5).

Proteínas do ciclo sináptico

As membranas das vesículas sinápticas, no terminal axonal, estão providas de complexos protéicos para fusão. Várias proteínas participam na exocitose dependente de cálcio (Figura 5 e Tabela II).

Conhecimentos recentes sobre a liberação sináptica vêm sendo, obtidos mediante estudos bioquímicos das interações protéicas do terminal pré-sináptico, efeitos de toxinas (tais como botulínica e tetânica), anticorpos específicos, e proteínas homólogas nos eventos sinápticos, além de mutações em camundongos e invertebrados através de "knockout" genético[6,7,22,23,24].

Secreção do neurotransmissor ereciclagem vesicular

Segundo *Thomas C. Südhof* [4], o ciclo da vesícula sináptica pode ser dividido em nove passos (Figura 6):

1. "Docking**"** (Ancoragem): Contato inicial entre as membranas da VS e membrana pré-sináptica, antes do amadurecimento vesicular. Esse contato inicial é garantido por um sistema de ancoragem, exercido por interações de proteínas da membrana vesicular e da zona ativa (local onde ocorre a extrusão do NT).

2. "Priming" (Engatilhado): As VS se tornam aptas para uma rápida e completa fusão com a membrana pré-sináptica. Provavelmente, neste estágio, há fusão parcial de membranas.

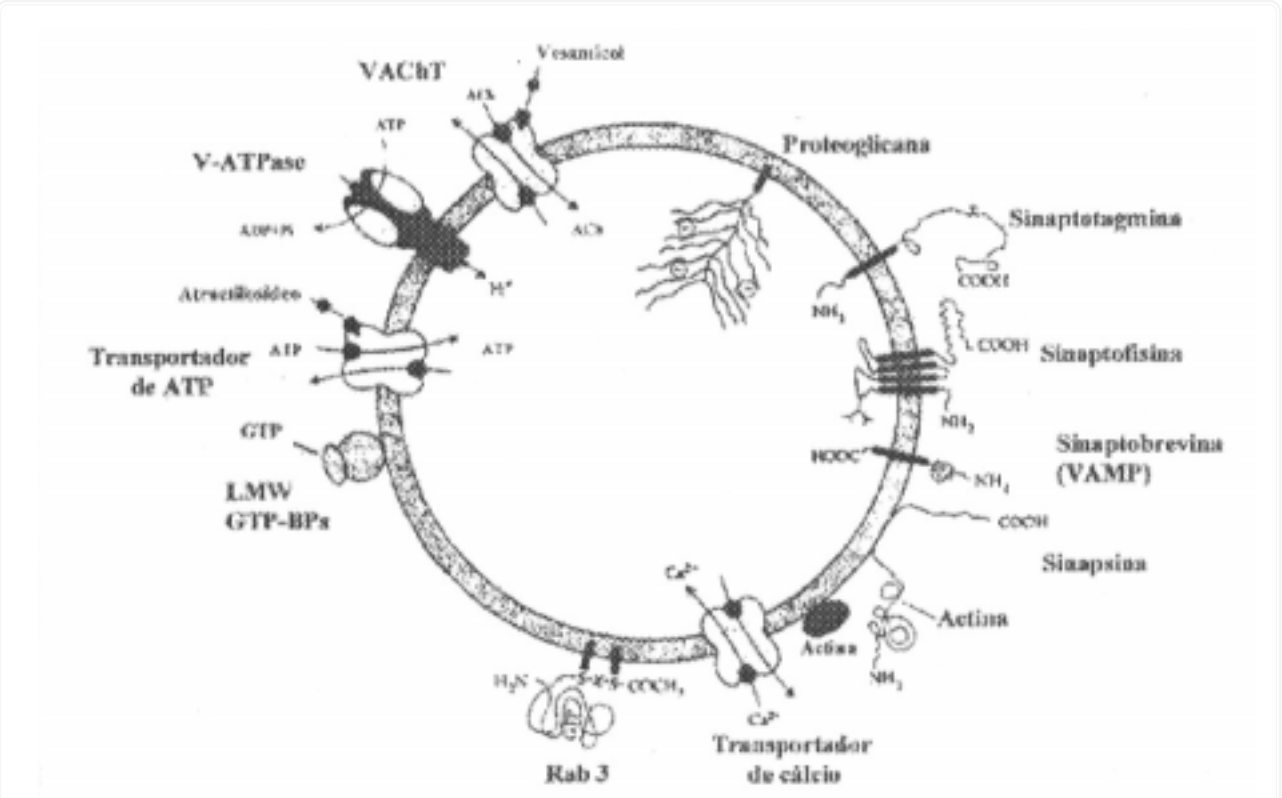

Figura 5 - Vesícula sináptica de acetilcolina (ACh) e suas proteínas de membrana. Adaptado de Robert, 1997 [43].

Tabela II - Proteínas envolvidas no processo de endocitose e exocitose das vesículas sinápticas

Proteínas da membrana da vesícula sináptica

SINAPTOBREVINA 1 e 2 (VAMP-1 e 2): Proteínas que interagem com a sintaxina e SNAP-25 na membrana pré-sináptica durante o "priming" da exocitose vesicular (11).

SINAPTOFISINA(S): Proteínas com quatro domínios transmembrânicos e de 38 KDa, que impedem a formação do núcleo complexo fora da zona ativa pela ligação com a sinaptobrevina (3). Importantes na biogênese da vesícula sináptica (11).

SINAPTOTAGMINAS (p65): Proteína transmembrânica de 58 KDa, definida como um sensor de cálcio, devido a seus domínios C2A e C2B. O domínio C2A, através de sua interação com cálcio, sofre uma alteração conformacional, levando-o a fusionar fosfolipídeos da membrana vesicular e pré-sináptica. Esta proteína é central na fusão das vesículas sinápticas pelo cálcio, assim como na reciclagem de vesículas sinápticas pelo domínio C2B.(19,20,25).

PROTEÍNA RICA EM CISTEÍNA: Ainda não é clara a função desta proteína. Parece ser importante na fusão vesicular com o endossoma (11).

RAB3A: Proteína de 25 KDa que se liga a GTP e GDP. Importante para o processo de tráfego intracelular e secreção sináptica. Funciona como uma "trava", durante uma intensa estimulação do terminal pré-sináptico, impedindo que todas as vesículas sejam exocitadas (11,24).

RABFILINA 3A: Possui 78 KDa e liga-se a GTP e a RAB3A, interagindo no tráfego vesicular (11,24).

SINAPSINAS (Ia, Ib, IIa, IIb): Fosfoproteínas que regulam a disposição das vesículas sinápticas para ancoragem e fusão, pelo controle de suas ligações com o citoesqueleto no "pool" vesicular (11,24).

Proteínas da Membrana Plasmática

SINTAXINA: Proteína de 35 KDa, componente do complexo 20S, juntamente com NSF, SNAPs e Sinaptobrevina, essenciais no processo de ancoragem e fusão vesicular. Anticorpos contra sintaxina e clivagem pela toxina botulínica bloqueiam a transmissão sináptica (11,21,22,24).

SNAP-25: Proteína do complexo 20S, de 25 KDa envolvida no processo de ancoragem e fusão (11,24).

GAP-43 (F-1, B-50 ou neuromodulina): Possui importante papel na neuritogênese, regeneração de nervos e LTP, bem como no processo inibitório da ancoragem e fusão vesicular (11).

NEUREXINAS: Proteínas de superfície celular, que podem atuar no reconhecimento célula-célula. Apresentam mais de mil (1000) isoformas, incluindo o receptor para α-latrotoxina (11).

Proteínas Citosólicas ou Citoplasmáticas

MUNC-18: Homólogo mamífero das proteínas NSEC1 (levedura) e UNC-18 (C. elegans) que se liga à sintaxina. Participa na secreção sináptica e inibição do processo de fusão fora da zona ativa (3,11,24).

NSF (N-ethylmealeimide-sensitive factor): Participa no tráfego vesicular intra-Golgi e na fusão exocitótica (11). Quando a NSF cliva ATP, ela deve promover uma alteração conformacional na sinaptobrevina, provocando rearranjos da membrana lipídica, facilitando a formação de uma vesícula hemifundida (24,26).

SNAPs: Envolvidas na fusão vesicular e nos processos de plasticidade sináptica (11).

Dinamina I: GTPase necessária à endocitose, fosforilada pela PKC e desfosforilada pela calcineurina mediante despolarização da membrana (11,24,27).

Proteína AP_2: Proteína que se liga à dinamina e à sinaptotagmina, iniciando a formação dos "pits" de clatrina para a endocitose (24).

Proteínas Adicionais

PITP e PIP5K: Proteínas que agem em fosfolipídeos, essenciais na reconstituição da secreção sináptica e na regulação da fusão vesicular (11).

ANEXINAS: Ligam-se ao cálcio e fosfolipídeos, podendo influenciar na restauração da secreção (11).

EXO-1: Funções pouco conhecidas, necessárias no processo de fusão e tráfego vesicular (11).

p145: Proteína cálcio-dependente, de 145 KDa, envolvida no "engatilhamento" do processo de fusão (11).

p115: Conjunção semelhante a anterior e participa no processo de transporte intra-Golgi e ancoragem (11)

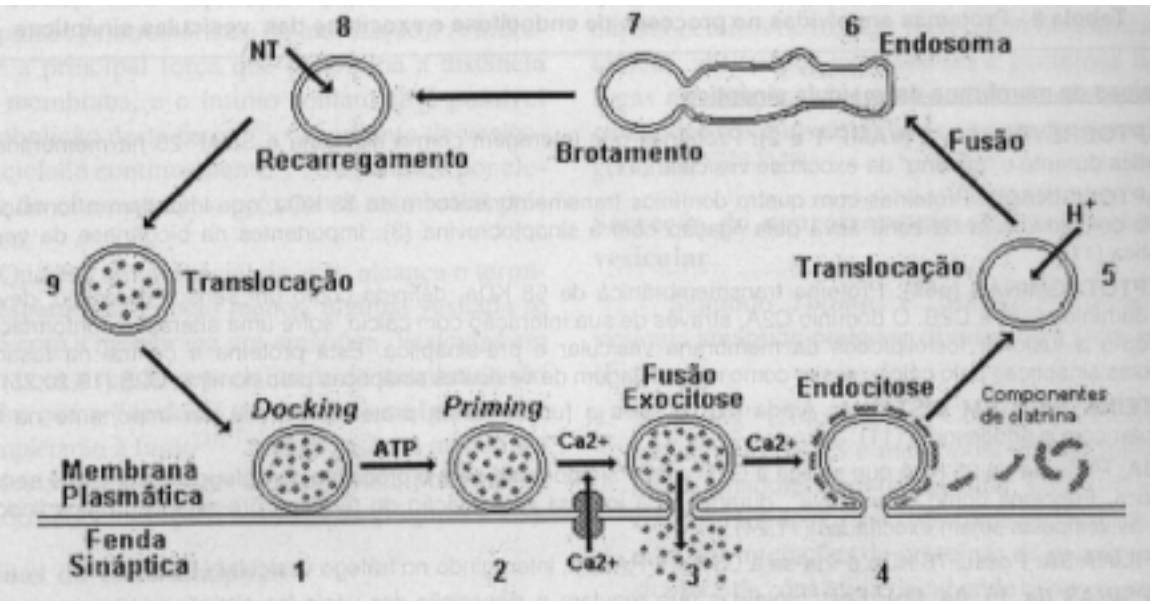

Figura 6 - *Os nove passos do ciclo da vesícula sináptica, de acordo com Südhof [4].*

3. Fusão/Exocitose: As membranas da VS e pré-sináptica se fusionam completamente, após rápida entrada de Ca^{2+} no citosol. Uma ou poucas vesículas são levadas à fusão completa, e o NT é extruído para a fenda sináptica.
4. Endocitose: As membranas das vesículas extruídas são internalizadas nos locais demarcados com clatrina, formando vesículas cobertas.
5. Translocação: As vesículas cobertas migram em direção ao endossoma, sofrem acidificação, e perdem a cobertura de clatrina.
6. Fusão com o endossoma: Nesta etapa, há um alto teor da proteína Rab5 nas vesículas sinápticas. A Rab5 é um marcador endossomal.
7. "Budding" (Brotamento): Estrangulamento do endossoma primário, com formação de VSs prontas para a recaptação de NT.
8. Recaptação de NT: As vesículas acumulam NT em seu interior, através de transporte ativo, dirigido por gradiente eletroquímico, produzido por uma bomba de prótons.
9. Translocação: As VSs migram de volta ao "pool" vesicular, e seguem para a zona ativa.

Processos difusionais, orientados pelo citoesqueleto, participam da migração vesicular.

Durante o "Priming", que provavelmente é deflagrado por despolarização do terminal axonal, ocorre a formação de um complexo protéico, formado por sintaxina, SNAP-25 e sinaptobrevina[15].

No estado de "Docking", o complexo não se forma, porque proteínas específicas, tais como Munc-18 e sinaptofisina, impedem a interação da sintaxina e sinaptobrevina, respectivamente[25,26,27] (Figura 7).

Depois da formação do núcleo 7S, junta-se a ele outra proteína, a αSNAP, que, por sua vez, cria um ponto de ligação para a proteína NSF, formando um segundo complexo protéico, chamado 20S. A NSF, clivando ATP, faz com que o complexo 20S seja inativado e haja a formação de um estado de hemifusão entre as membranas plasmática e vesicular[28,29]. Uma vez formado este estado de hemifusão, a entrada de Ca^{2+} produz a alteração conformacional na sinaptotagmina, cujo domínio C2A dispara, à fusão vesicular completa[4,6,7,30,31]. O domínio C2B da sinaptotagmina parece estar envolvido na recaptação de membrana após a extrusão[6,7].

A formação das cavéolas encapadas com clatrina ("pits" de clatrina) e, conseqüentemente, a endocitose são iniciadas pela desfosforilação da proteína dinamina pela calcineurina. A dinamina se liga então à proteína AP_2, possibilitando a ligação da AP_2 à sinaptotagmina, no domínio C2B, levando ao processo de endocitose[7,32,33].

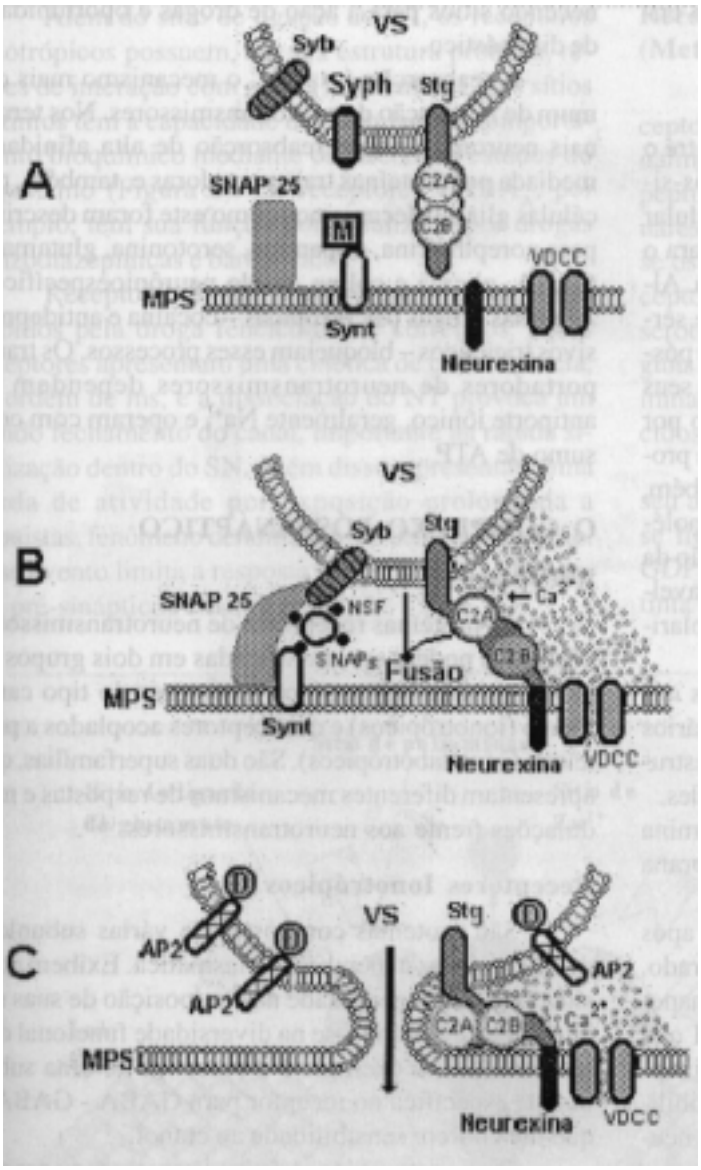

Figura 7 - *Detalhe das interações protéicas durante a exocitose e início da endocitose da vesícula sináptica (VS). A-C, prováveis etapas da exocitose mediada por Ca^{+2} e rápida endocitose.*

A) o "docking" (ancoragem) começa quando a sintaxina (Synt) interage com Munc18 (M), e sinaptobrevina (Syb) com a sinaptofisina (Syph).

B) durante o "priming", a SNAP-25 forma um complexo com a Synt, criando um sítio de ligação de alta afinidade para a Syb. Esse complexo atua como receptor para alfa, beta e gama-SNAPs, onde se liga NSF. A NSF rompe o complexo sináptico através da hidrólise de ATP, levando à hemifusão com Syb. Sinaptotagmina (Stg) conecta a VS à membrana pré-sináptica (MPS) mediante a neurexina e atua como sensor de Ca^{+2} pelo seu domínio C2A. Durante a despolarização da MPS, o canal de Ca^{+2} operado por voltagem é aberto. O Ca^{+2} ativa o domínio C2A, completando a fusão das membranas mediante interação com Synt.

C) imediatamente após a fusão, o domínio C2B da Stg atua como receptor para o complexo de clatrina (AP2). Dinamina se associa a AP2, produzindo a endocitose.

(Figura original dos Autores).

O cálcio

O Ca^{2+} desempenha um importante papel na regulação de uma grande variedade de processos neuronais. Os neurônios utilizam fontes extra e intracelulares deste íon. O influxo de Ca^{2+} através dos canais operados por voltagem provoca a "secreção" do NT. Tal influxo leva à formação dos microdomínios de cálcio que se localizam, preferencialmente, nas zonas ativas dos terminais pré-sinápticos, em correspondência com os "pools" de VSs[34].

A liberação do NT também pode ser regulada pelo Ca^{2+} liberado de estoques intracelulares[35/38], com a participação de canais de Ca^{+2} ativados por inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) ou rianodina (RYRs), distribuídos pelo retículo endoplasmático (RE) e responsáveis pelo aumento da concentração de Ca^{2+} necessária para a exocitose. O retículo endoplasmático é uma rede contínua, distribuída por toda a célula. Pode ser considerado como um neurônio dentro de outro neurônio devido ao fato de apresentar, como a membrana plasmática, propriedades integrativas e regenerativas, que poderiam desempenhar um papel importante na sinalização neural[39].

A despolarização induz, pelo menos, dois processos, a abertura de canais de Ca^{2+} operados por voltagem (a entrada de Ca^{+2} se dá em 0,8 ms) e a ativação da maquinaria de liberação do NT. A maquinaria de liberação do NT é formada pelo complexo protéico pré-sináptico, próximo aos canais de Ca^{2+}. De acordo com o estado conformacional desse complexo, como discutido na sessão anterior, a maquinaria é ativada ou desativada. O estado ativado interage com o Ca^{2+} e induz a fusão de membranas e a liberação do NT. A repolarização desativa esse estado, voltando a uma situação indiferente às altas concentrações de Ca^{2+}. O Ca^{2+}, então, é necessário como cofator e não controla o tempo de liberação, mas, sim, junto com o estado ativo, a quantidade de liberação[18]. O que parece ocorrer é uma adaptação dos receptores protéicos aos altos níveis de cálcio, limitando a quantidade de NT liberada pelo terminal. Nessa condição, as vesículas sinápticas têm diminuída sua fusão mesmo na

presença de Ca^{2+}. A adaptação contribui para o encerramento da liberação[40].

A Fenda sináptica

Espaço de aproximadamente 10-50 nm entre o terminal axonal pré-sináptico e a membrana pós-sináptica. A FS é contínua com o fluido extracelular que serve como condutor de baixa resistência para o deslocamento iônico, além da superfície sináptica. Algumas vezes, há filamentos inter-sinápticos que servem para manter associadas as membranas pré e pós-sinápticas e, talvez, guiar os neurotransmissores a seus sítios receptores [41]. Esse material é constituído por proteoglicanas com propriedades hidrofílicas, que produzem fluidos mucilaginosos e lubrificantes. Também, observa-se, na fenda, a presença de caderinas, moléculas de adesão celular, envolvidas na manutenção da sinapse [42]. Células gliais próximas à FS, provavelmente, participam na remoção de NT após a repolarização e na sinalização interneural.

Diferentes glicoproteínas são encontradas nas membranas sinápticas associadas à enzimas de vários tipos, como glicosil transferases, que alteram as estruturas glicídicas de glicoproteínas, e exoglicosidades.

Provavelmente, o tamanho da fenda determina o tempo em que o NT secretado alcança a membrana pós-sináptica (Tabela I).

A remoção de neurotransmissores da FS, após sua liberação, é um processo finamente orquestrado. Se a substância neurotransmissora liberada permanecesse mais do que o necessário, um novo sinal que chegasse ao terminal poderia ser bloqueado. A sinapse poderia se tornar refratária devido à dessensibilização dos receptores pela contínua exposição aos neurotransmissores.

Conhecem-se três mecanismos pelos quais o tecido nervoso retira o excesso de substâncias transmissoras solúveis e não ligadas a receptores: difusão, degradação enzimática e reabsorção.

A difusão remove lentamente uma parte dos mensageiros químicos presentes na fenda.

A degradação enzimática é feita pela enzima acetilcolinesterase, no sistema colinérgico. A enzima inativa rapidamente as moléculas de acetilcolina (Ach) na fenda, encurtando a transmissão sináptica e favorecendo a recaptura da colina pelo terminal. Existem muitas vias enzimáticas que degradam neurotransmissores dentro dos neurônios. Essas enzimas podem ser importantes para controlar a concentração de NT intraneuronal ou inativá-los após a secreção na fenda. Muitas dessas vias são de importância clínica, fornecendo sítios para a ação de drogas e oportunidade de diagnóstico.

A reabsorção é, talvez, o mecanismo mais comum de inativação de neurotransmissores. Nos terminais neuronais, existe reabsorção de alta afinidade, mediada por proteínas transportadoras e, também, por células gliais. Mecanismos como este foram descritos para norepinefrina, dopamina, serotonina, glutamato, GABA, glicina e colina, sendo neurônioespecíficos. Algumas drogas psicotrópicas – cocaína e antidepressivos tricíclicos – bloqueiam esses processos. Os transportadores de neurotransmissores dependem de antiporte iônico, geralmente Na^+, e operam com consumo de ATP.

O COMPLEXO PÓS-SINÁPTICO

Receptores

As proteínas receptoras de neurotransmissores (Tabela I) podem ser classificadas em dois grupos de proteínas membranares: os receptores do tipo canal iônico (ionotrópicos) e os receptores acoplados a proteínas-G (metabotrópicos). São duas superfamílias, que apresentam diferentes mecanismos de respostas e modulações frente aos neurotransmissores [43].

Receptores Ionotrópicos

São proteínas compostas de várias subunidades, associadas à membrana plasmática. Exibem considerável heterogeneidade na composição de suas subunidades, refletindo-se na diversidade funcional dos receptores. Um exemplo é a presença de uma subunidade específica no receptor para GABA - $GABA_A$, que lhe confere sensibilidade ao etanol.

Os receptores ionotrópicos apresentam, em sua estrutura, um sítio de ligação para o NT e um canal iônico intrínseco. A despolarização ou hiperpolarização da membrana pós-sináptica depende da permeabilidade desse canal a íons específicos. Alguns canais iônicos, como os ativados por Ach (tipo nicotínicos), glutamato e serotonina (tipo 5-HT3), possuem permeabilidade não específica para cátions univalentes e geram despolarização por influxo de Na^+ através da membrana. O receptor de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), além de ter alta condutância ao Na^+, apresenta alta condutância ao Ca^{+2} (Figura 8). Receptores do tipo $GABA_A$, assim como aqueles para o aminoácido glicina, são permeáveis aos íons Cl^-. A passagem desses íons pela membrana plasmática, geralmente, conduz a uma hiperpolarização do terminal pós-sináptico.

Além do sítio de ligação ao NT, os receptores ionotrópicos possuem, em sua estrutura protéica, regiões de interação com outras moléculas. Esses sítios distintos têm a capacidade de modular seu comportamento bioquímico mediante os diferentes estados do organismo (Figura 8). Os receptores $GABA_A$, por exemplo, têm sua função potencializada por drogas benzodiazepínicas e barbitúricos.

Receptores do tipo NMDA, por outro lado, são inibidos pela droga fenciclidina e correlatos. Esses receptores apresentam uma cinética de curta latência, da ordem de ms, e a dissociação do NT provoca um rápido fechamento do canal, importante na rápida sinalização dentro do SN. Além disso, apresentam uma perda de atividade por exposição prolongada a agonistas, fenômeno denominado de dessensibilização. Esse evento limita a resposta pós-sináptica a elementos pré-sinápticos em alta atividade.

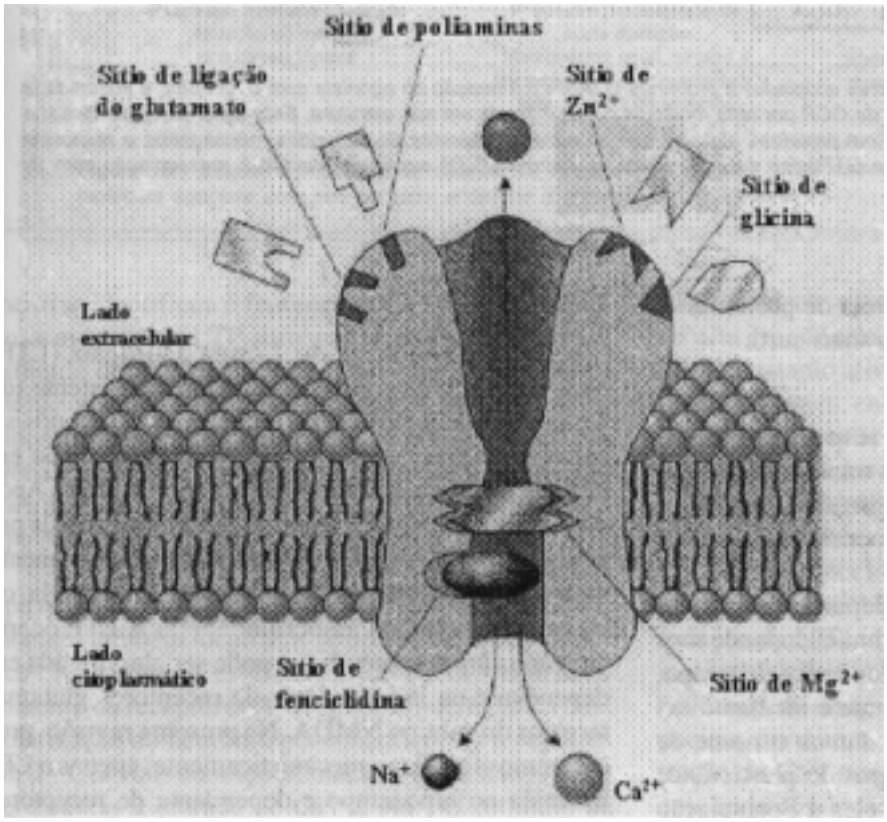

Figura 8 - *Desenho esquemático de um receptor glutamatérgico, ionotrópico do tipo NMDA, mostrando várias possibilidades de modulação de sua atividade. O glutamato (agonista endógeno) interage diretamente com o receptor, produzindo aumento nas condutâncias de Na^+, K^+ e Ca^{+2} através do canal. Outras moléculas e íons apresentam sítios de ligação neste receptor, modulando sua atividade positivamente (glicina, poliaminas) ou negativamente (Mg^{+2}, Zn^{+2}, fenciclidina). FC, fenciclidina. Adaptado de Robert, 1997 [43].*

Receptores acoplados a proteínas-G (Metabotrópicos)

Os receptores metabotrópicos diferem dos receptores ionotrópicos, tanto estrutural quanto funcionalmente. Eles consistem de uma única cadeia polipeptídica que apresenta sete domínios transmembranares. Dentre os receptores dessa classe, encontram-se os receptores muscarínicos para Ach, todos os receptores dopaminérgicos e adrenérgicos, todos os serotoninérgicos (à exceção do receptor 5-HT3), alguns glutamatérgicos, o receptor $GABA_B$, o de histamina, dos canabinóides e todos os receptores conhecidos de neuropeptídeos.

Essas proteínas receptoras operam através de seu acoplamento a proteínas-G, assim chamadas por se ligarem a moléculas de GTP (na forma ativa) e GDP (na forma inativa). Pertencem a uma família distinta das proteínas Rab, que participam da secreção sináptica (Figura 9). Cada receptor metabotrópico interage com um tipo específico de proteína-G, o que lhe confere especificidade na resposta celular. Uma vez ativada, a proteína-G age, estimulando ou inibindo proteínas efetoras que, em geral, catalizam a síntese de segundos mensageiros: cAMP, cGMP, diacil glicerol (DAG), IP3 (inositol trifosfato) e ácido araquidônico (AA).

Durante a cascata de ativação celular, essas moléculas irão desencadear uma variedade de processos bioquímicos, que podem incluir da abertura ou fechamento de canais iônicos até a síntese protéica (Figura 10).

Os eventos celulares, mediados por segundos mensageiros, têm latências de ms, até minutos. Por tais características, esse sistema atua na sinalização lenta porém sustentada, modulando a atividade de neurotransmissão rápida. Tam-

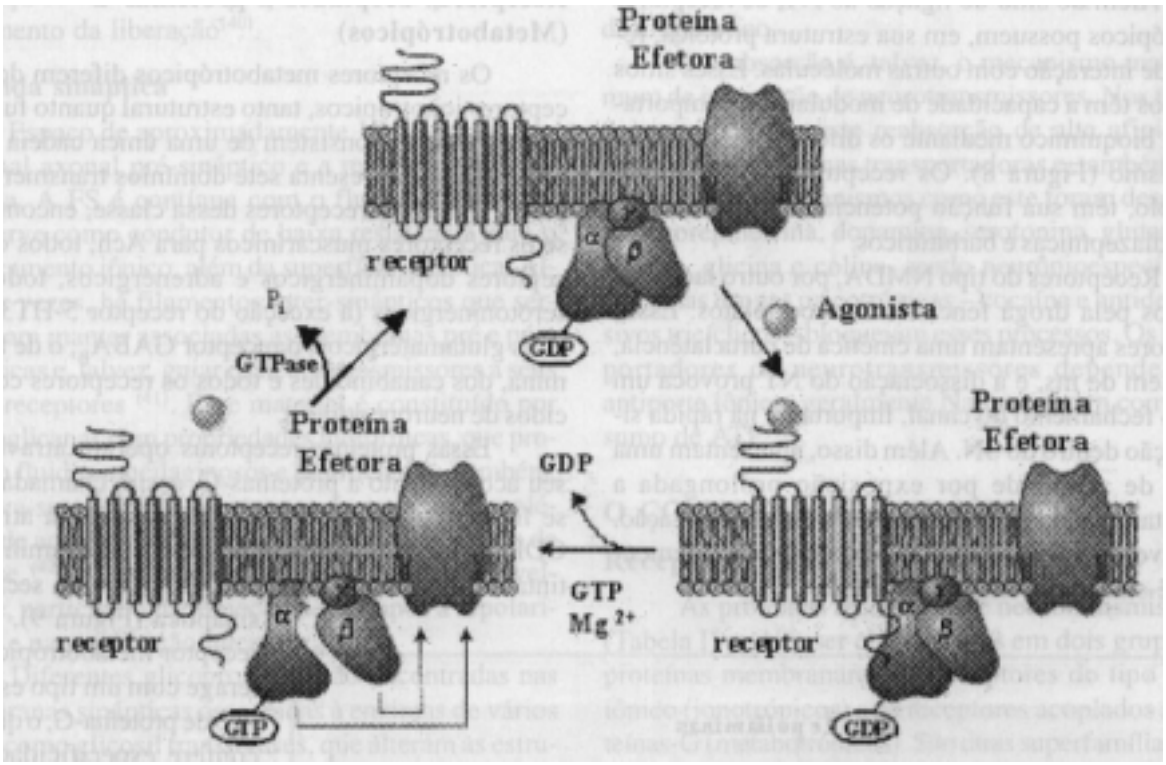

Figura 9 - *Modelo de ação de receptores acoplados a proteínas-G. Após a interação do agonista com o receptor, a subunidade α da proteína-G troca uma molécula de GDP por uma molécula de GTP ligada em sua estrutura. Esta subunidade se dissocia das subunidades β e γ, e interage com proteínas efetoras que produzem moléculas de segundos mensageiros e respostas intracelulares específicas. A atividade GTPásica da subunidade α hidrolisa GTP em GDP, levando à reassociação com βγ e sua inativação [43].*

bém é observada a modulação direta de proteínas-G sobre canais iônicos, com latência mais curta.

Plasticidade sináptica

Até o momento, falamos a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na transmissão sináptica, sem considerarmos como o organismo utiliza essa unidade funcional para gerar a imensa variedade de comportamentos de um animal.

Cada sinapse funciona independentemente e apresenta um padrão de atividade dinâmico, onde suas propriedades podem se modificar ao longo do tempo, em resposta a estímulos do ambiente e mediante experiência. A essas modificações damos o nome de *Plasticidade Sináptica*. Vários tipos de plasticidade sináptica ocorrem no SN, dentre eles a Potenciação de Longa Duração (LTP) e a Depressão de Longa Duração (LTD), que são fenômenos caracterizados por aumento ou redução na eficácia da comunicação sináptica, respectivamente, e são os principais correlatos moleculares dos processos de aprendizado e memória [44].

LTP

A Potenciação de Longa Duração (LTP) pode ser definida como um aumento persistente (de horas/dias) do potencial de repouso da célula pós-sináptica, desencadeado por um estímulo tetânico em uma via sináptica específica (estímulo de 100Hz). Após uma série de eventos bioquímicos nos terminais pré e/ou pós-sinápticos, esse estímulo promove o aumento da eficiência de transmissão sináptica naquela via, ou mesmo, em uma via associada[44,45,46]. A LTP ocorre em várias áreas do cérebro e pode ser classificada em dependente ou independente de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA. Na presente revisão, procuraremos focalizar, mecanisticamente, apenas a LTP induzida no hipocampo e dependente de receptores NMDA (Figura 11).

Indução da LTP - papel dos receptores NMDA e dos íons de cálcio

O hipocampo é uma estrutura cortical, envolvida na formação da memória, em mamíferos, onde pri-

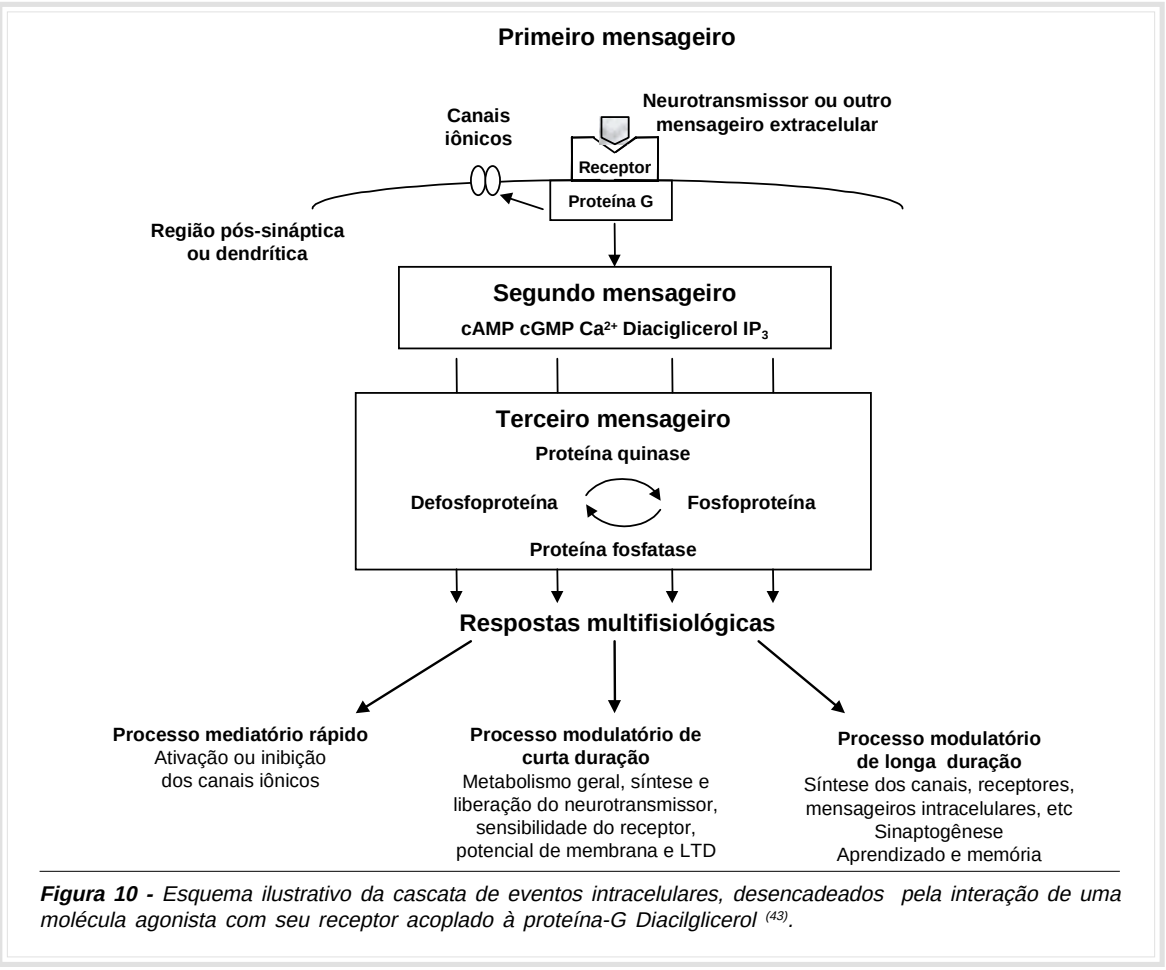

Figura 10 - *Esquema ilustrativo da cascata de eventos intracelulares, desencadeados pela interação de uma molécula agonista com seu receptor acoplado à proteína-G Diacilglicerol [43].*

meiro se identificou o fenômeno de LTP. No hipocampo, a indução da LTP somente se realiza quando um estímulo de alta frequência, como o tetânico, ativa simultaneamente o neurônio pré e pós-sináptico, envolvidos em uma via de transmissão, como postulado por Donald Hebb[47]. Esse tipo de estímulo é necessário para a ativação de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA no neurônio pós-sináptico[48].

Sabe-se que receptores glutamatérgicos do subtipo AMPA (α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) também localizam-se no neurônio pós-sináptico[48]. Durante a estimulação de baixa freqüência, somente os receptores AMPA contribuem para a despolarização do neurônio pós-sináptico. Os receptores NMDA, em tais condições, mantêm-se fechados e impermeáveis à entrada de Ca^{2+} e Na^{+}. O estímulo de baixa frequência não é competente para retirar o bloqueio produzido pelo íon magnésio, que, constitutivamente, bloqueia seu canal, mesmo com a ligação do glutamato em seu sítio receptor. O desbloqueio do canal é operado por voltagem. Somente quando o agonista está ligado ao receptor e a célula está suficientemente despolarizada, ele se abre[48,49]. Portanto, na estimulação de alta freqüência, tanto receptores AMPA quanto NMDA estarão ativados e contribuindo para a resposta pós-sináptica, enquanto que, em estímulos de baixa freqüência, somente se ativam os receptores AMPA.

O uso de antagonistas de receptores NMDA faz com que a indução de LTP fique bloqueada, aumentando, assim, as evidências da participação desses receptores no processo[50,51]. A aplicação de EGTA (um quelante de Ca^{2+}) no neurônio pós-sináptico inibe a indução da LTP, indicando a importância do Ca^{2+} na iniciação do fenômeno[52]. Além disso, técnicas experimentais de imagem, através do uso de corantes especiais, permitem demonstrar o aumento da concentração de Ca^{2+} nos espinhos dendríticos pós-sinápticos, após a indução de LTP[53].

Além do Ca^{2+}, provindo da ativação dos receptores NMDA, a ativação de canais de Ca^{2+} operados por voltagem e de estoques intracelulares de Ca^{2+}, devem contribuir para o alcance da concentração necessária ao disparo da LTP. A liberação de Ca^{+2}, dos estoques intracelulares, seria ativada pelo próprio

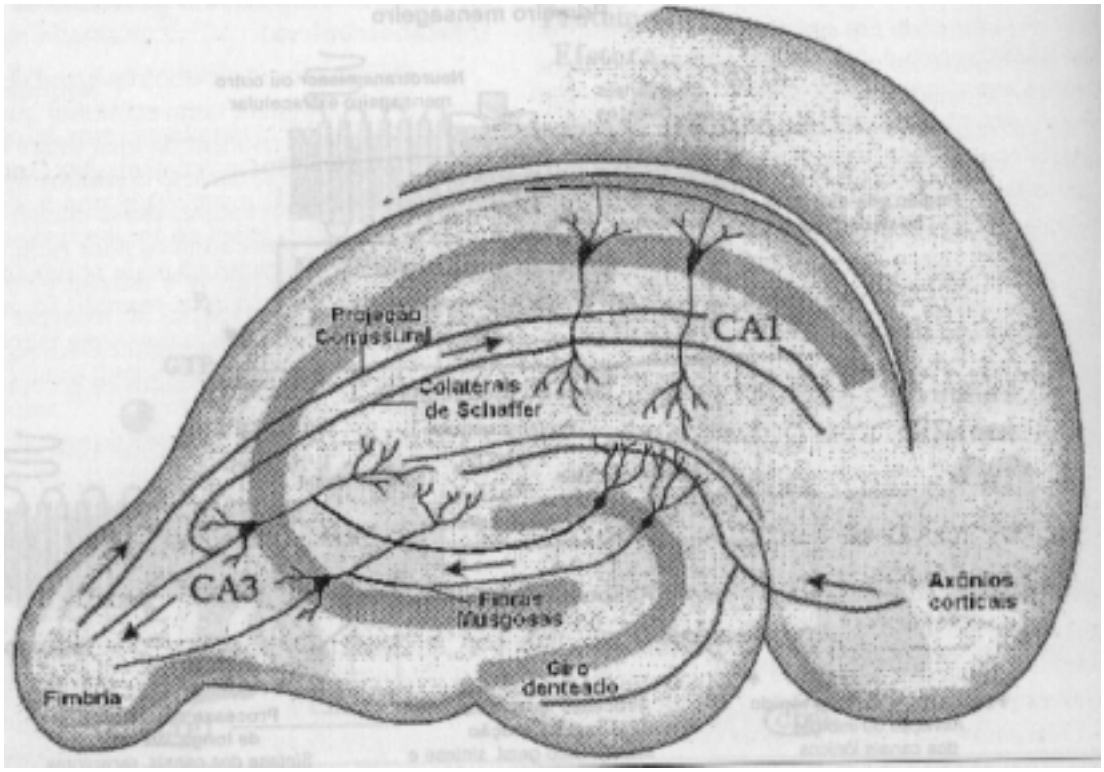

Figura 11 *- Vias excitatórias, usadas no estudo de LTP e LTD, em fatias de hipocampo. No circuito hipocampal, o córtex entorrinal projeta fibras para as células granulares através da via perfurante e os axônios das células granulares (fibras musgosas) fazem sinapses com células piramidais da camada CA3. Estas, por sua vez, se projetam para a camada CA1 (colaterais de Schaffer) que retornam ao córtex entorrinal*[45]*. A LTP pode ser observada nestas sinapses que utilizam, principalmente, o glutamato como neurotransmissor.*

íon (via receptor NMDA) e por moléculas de IP_3 liberadas durante a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo metabotrópico - mGlu [44].

Em resumo, o aumento da resposta pós-sináptica gerada pode ser o resultado da ação final de vários compartimentos:

1. modificações pré-sinápticas: na quantidade de L-glutamato liberado por impulso;
2. modificações pós-sinápticas: aumento no número de receptores pós-sinápticos ou alterações em suas propriedades funcionais;
3. alterações extra-sinápticas: redução na recaptação de L-glutamato pelas células gliais, aumentando a disponibilidade do NT;
4. alterações morfológicas.

Mecanismos de transdução do sinal após ativação de receptores NMDA

A indução da LTP, no terminal pós-sináptico, envolve uma intrincada cascata de eventos bioquímicos. Ao longo do processo, muitas proteínas entram em cena, tendo destaque as proteínas quinases. Dentre elas, temos a proteína quinase II dependentes de Ca^{2+}/calmodulina (CaMKII), a proteína quinase C (PKC) e a proteína quinase A (PKA). As duas primeiras já são conhecidas por serem ativadas de uma maneira dependente de receptor NMDA através de estimulação tetânica[48,54]. A PKA, por sua vez, é ativada na presença de altos níveis de cAMP, gerados pela ação da enzima adenilato ciclase, existentes durante a LTP[55]. Inibidores dessas enzimas são capazes de reduzir e/ou impedir a LTP[44]. O mesmo ocorre em animais que apresentam ausência da expressão do gene para CaMKII [56]. Esta enzima, quando ativada por Ca^{2+}/calmodulina, se autofosforila, adquirindo atividade permanente, a qual, somada com a de outras quinases, pode explicar a manutenção da LTP por períodos prolongados[57].

Considerando que a LTP tenha um tempo de duração longo, porém variável, tem-se suposto que aquelas formas mais curtas utilizam, para a sua manutenção, proteínas quinases já sintetizadas, enquanto as formas mais longas, envolveriam, além disso, a ativação da expressão gênica dessas enzimas[44].

A entrada de grandes quantidades de Ca^{2+}, via receptor NMDA, além do Ca^{2+}o provindo dos estoques intracelulares e dos canais de Ca^{2+} operados por voltagem, ativa a calmodulina. Essa proteína que é modulada por Ca^{2+}, interage com a proteína quinase CaMKII, ativando-a. A CaMKII, por sua vez, pode atuar, modificando a cinética de receptores AMPA, aumentando sua condutância ao Na^{+} ou sua afinidade pelo L-glutamato, incrementando a resposta pós-sináptica a estímulos subseqüentes e conseqüente LTP[48]. De fato, o uso do inibidor de quinases K-252b dificulta a LTP[58]. Outra quinase possível de executar à fosforilação de receptores AMPA é a PKA, visto que esses receptores, em sua seqüência primária, possuem uma série de regiões candidatas a serem sítios de fosforilação da citada enzima[44]. A ação da PKA mantém ativo o inibidor da proteína fosfatase 1, sendo um evento importante para a manutenção da LTP, já que a proteína fosfatase 1 antagoniza o efeito da LTP, favorecendo a LTD. Isso se dá pela desfosforilação de quinases[48] (Figura 12).

Os eventos moleculares, desencadeados pela LTP, podem aumentar o número de receptores AMPA no neurônio pós-sináptico, ativando sua expressão gênica[59]. Também poderiam modificar o processamento pós-traducional das cadeias polipeptídicas, constituintes do citado receptor, facilitando a produção de um receptor AMPA com cinética mais rápida[44].

No terminal pós-sináptico, a PKC também pode fosforilar os receptores NMDA, diminuindo sua susceptibilidade ao bloqueio por íons Mg^{2+}[60]. Outras substâncias, como o AA e IP_3, liberadas pela ativação dos receptores mGlu, podem potenciar a função dos receptores NMDA[61,62]. Essas modificações seriam responsáveis pelo aumento da eficiência de transmissão sináptica em uma determinada via neuronal.

Durante muito tempo, foi discutido se o aumento da eficiência na transmissão sináptica, levada a termo pela LTP, ocorreria apenas no terminal pós-sináptico, ou somente no terminal pré-sináptico. Apesar de ainda haver controvérsias, o mais aceito é que as modificações ocorram em ambos os terminais[44,63,64].

A possibilidade de modificações pré-sinápticas, sugere a existência de mensageiros retrógrados, que, produzidos ao nível pós-sináptico, atingiriam o terminal pré-sináptico, promovendo alterações que levariam à LTP.

Vias sinápticas estimuladas simultaneamente a diferentes freqüências

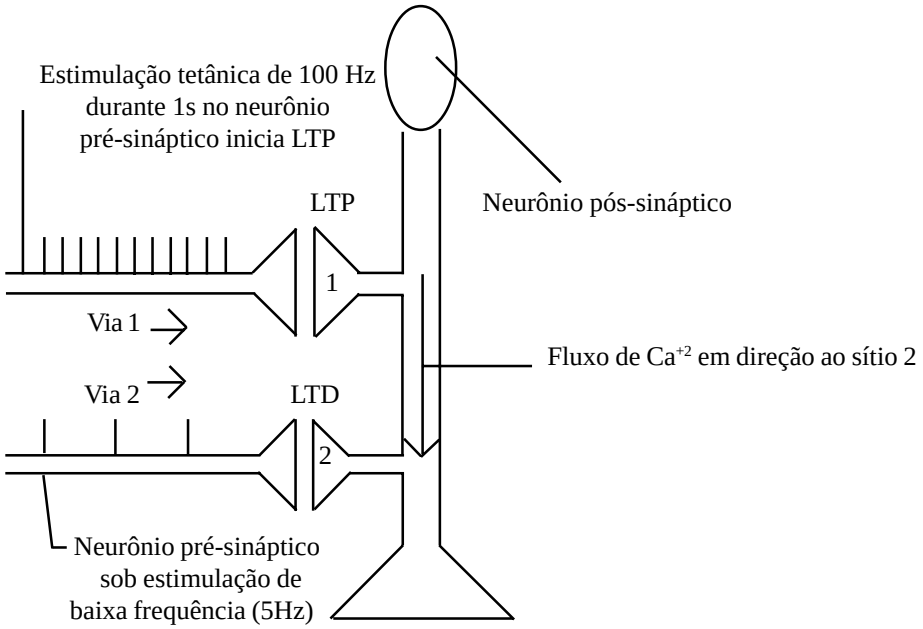

Figura 12 - *Mecanismos bioquímicos que definem a formação de LTP ou LTD numa via sináptica, de acordo com a concentração de Ca^{+2} alcançada no neurônio pós-sináptico. A via I é ativada em altas concentrações de Ca^{+2} e a via II em concentrações baixas deste íon. Se a PKA é ativada (via I), o inibidor da fosfatase I é fosforilado, impedindo a desativação da enzima CaMKII pela fosfatase I, facilitando então a LTP. Por outro, se a calcineurina é ativada (via II), o inibidor da fosfatase I é desfosforilado, permitindo a desativação da enzima CaMKII, facilitando a LTD. Adaptada de Lindon & Connor, 1995*[92]

Os mensageiros, no terminal pré-sináptico, aumentariam a quantidade de NT liberado a cada impulso e também poderiam inibir a recaptação de glutamato em células gliais[44].

Dois candidatos a mensageiros retrógrados são o óxido nítrico (NO) e o AA. A favor do NO existem as seguintes evidências: 1 - em cultura de neurônios, o NO tem sua concentração aumentada no meio extracelular após a LTP[65]; 2 - induz aumento de freqüência nos potenciais em miniatura, em cultura de células hipocampais[66] e 3 - inibidores da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) bloqueiam a LTP[67]. No entanto, estudos histoquímicos têm demonstrado a presença dessa enzima nos interneurônios hipocampais e sua ausência nas células do giro denteado e células piramidais[68].

Há um aumento na concentração de AA no meio extracelular de neurônios em cultura, após LTP[69]. Inibidores da fosfolipase A_2, enzima que libera tal composto a partir de fosfolipídeos da membrana, bloqueiam a LTP[70]. Há ainda a possibilidade de o K^+ e de o glutamato agirem como mensageiros no terminal pré-sináptico[44].

Suspeita-se que o mensageiro retrógrado aumente a liberação do NT através da manutenção de elevadas concentrações de Ca^{+2} no terminal pré-sináptico, durante a LTP[71]. Outra possibilidade seria um maior influxo de Ca^{+2} por potencial de ação[44] e/ou um aumento da afinidade da maquinaria celular pelo Ca^{2+}[72].

LTD

A LTD, descrita como uma diminuição atividade dependente na transmissão sináptica, por longos períodos, tem sido identificada principalmente no hipocampo[73], entre neurônios piramidais da área CA3 e CA1 (Figura 11), e no cerebelo[74,75], entre fibras paralelas (FP) e células de Purkinje (CP). Durante a última década, alguns mecanismos que controlam a indução dessa forma de plasticidade sináptica têm sido identificados.

A indução de LTD na via das FP's é desencadeada pelo influxo de Ca^{+2} em CPs, através de canais de Ca^{+2} operados por voltagem e pela ativação de receptores de glutamato ionotrópico do tipo AMPA e metabotrópico do tipo mGluR1. É, geralmente, aceito que, após o aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular, ocorra uma cascata de segundos mensageiros envolvendo a ativação da proteína kinase C (PKC) e a produção de NO[76]. Mais especificamente na LTD hipocampal, a entrada de Ca^{2+}, via receptores NMDA, ativaria a proteína calcineurina, uma fosfatase dependente de Ca^{2+}-calmodulina (fosfatase 2B;) [77,78] conduzindo à desfosforilação do inibidor 1, proteína que, em seu estado fosforilado, inibe a ativação da fosfoproteína fosfatase 1 (PP1)[79]. A desinibição de PP1 é o evento subjacente à diminuição da transmissão sináptica, associada à LTD. Bolshakov & Siegelbaum[80] mostraram a participação do ácido araquidônico como um mensageiro retrógrado durante a manutenção da LTD.

Embora o Ca^{+2} tenha se mostrado de real importância na LTD cerebelar, o significado fisiológico da liberação de Ca^{+2} de estoques intracelulares permanece em discussão. Dendritos das CP expressam dois tipos de estoques de liberação interna: os sensíveis a rianodina e os sensíveis a (IP_3), sendo sugerido que a cascata de eventos que conduz à LTD pode envolver a liberação desses estoques além da entrada de Ca^{+2} pelos canais operados por voltagem[81,82]. Mesmo que, em alguns protocolos, a liberação de Ca^{+2} de estoques intracelulares seja necessária para induzir LTD, ainda não está claro se esta liberação, combinada com a despolarização de CP é suficiente para gerar LTD, na ausência de estimulação das fibras paralelas.

Alguns experimentos, em fatias de cerebelo, reforçam a idéia de que o NO é um sinal crucial nos eventos que levam à LTD. No cerebelo, a enzima sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS) tem sido identificada em CP através de RT-PCR, a partir de mRNA, obtido por "patch-clamp"[83]. Por outro lado, a nNOS é expressa em altos níveis nas fibras paralelas e nas células em cesto[84,85]. Dada essa localização, foi sugerido que, após um aumento de Ca^{+2} intracelular nas CP, o efluxo resultante de K^+, através de canais de K^+, Ca^{+2} e dependentes despolariza elementos pré-sinápticos vizinhos, a ponto de produzir NO e ativar a enzima guanilato ciclase de CP próximas, por um efeito parácrino[84,86].

Existem algumas evidências sobre os mecanismos de manutenção da LTD potencialmente envolvidos na memória de longa duração. Em CP em cultura, o estabelecimento de uma fase tardia de LTD cerebelar (começando 30-45 min. após o protocolo de indução) requer síntese protéica pós-sináptica[87]. Além disso, a completa ativação de PKC, necessária à indução de LTD, envolve a ativação da enzima fosfolipase A_2 Ca^{+2} dependente (PLA_2), somando-se à cascata intracelular de produção de diacilglicerol (DAG) [81,88]. O uso de animais geneticamente alterados para diferentes genes tem mostrado ser importante na compreensão da LTD. O bloqueio da expressão do gene para o receptor mGluR1α1 mostrou alteração na indução de LTD[89,90], enquanto que o bloqueio da proteína PKCγ não apresentou mudanças no padrão de LTD cerebelar em camundongos[91], embora inibidores de PKC levem à abolição de LTD. Isso mostra que devem existir mecanismos compensatórios.

LTP ou LTD ?

Tanto a LTP, quanto a LTD são processos dependentes de Ca^{+2}. No hipocampo, o que define se uma via sináptica produzirá LTP ou LTD é a freqüência do estímulo, e o aumento correspondente da concentração de Ca^{+2}. Em concentrações baixas deste íon, haverá LTD[92,93], e, em concentrações altas, LTP [43,44,48].

Se após estímulo, altas concentrações de Ca^{+2} se estabelecerem no terminal pós-sináptico, o íon ligado à calmodulina ativará enzima adenilato ciclase (AC). A AC, por sua vez, produzirá grandes quantidades de cAMP, ativando a PKA. Esta última fosforila o inibidor da fosfatase I, impedindo a LTD e facilitando a LTP. No entanto, se a concentração de Ca^{+2}, atingida no terminal, for apenas baixa, o complexo Ca^{+2} e calmodulina ativará a enzima calcineurina. A calcineurina desfosforila o inibidor da fosfatase I, permitindo que esta atue sobre proteínas como a CaMKII, impedindo a LTP e facilitando a LTD[48,93] (Figura 12).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Pela leitura desta bibliografia, constatamos que, na transmissão sináptica, participam numerosas proteínas conhecidas e provavelmente outras desconhecidas e que as funções das proteínas conhecidas não estão totalmente elucidadas.

Concluimos, portanto, que há muito trabalho a ser realizado por biólogos moleculares e estruturais, bioquímicos, farmacólogos e eletrofisiólogos na busca de esclarecer o papel e a interação das proteínas sinápticas para chegarmos a compreender o funcionamento do sistema nervoso, incluíndo memória, aprendizado e estado de consciência.

AGRADECIMENTOS

A Gabriel M. Arisi e Roy E. Larson pela leitura crítica do manuscrito; a José Augusto Maulin, Maria Dolores Ferreira e Silvia Regina Andrade Nascimento, pelo excelente auxílio técnico. JEM, ao suporte técnico parcial da FAPESP 95/6206-0 e 97/3026-6.

POLLI LOPES AC; CASALETTI ROSA L; BELEBONI RO; PEREIRA RNR; VASCONCELOS CAC & MOREIRA JE. Molecular aspects of synaptic Ttransmission. **Medicina,** Ribeirão Preto, 32: 167-188, apr./june 1999.

ABSTRACT: The Central Nervous System produces our conscious state out of various external inputs in a continuous stream of information and storing a lifetime of memories, while keeping track of the concentration of our internal fluids and the work of muscles and glands. Synaptic transmission is the key process of all that activity. Billions of neurons communicate with each other via thousands of synapses, each of which is independently regulated. From that complexity, instead of chaos, arises the pristine order of information processed by the brain. The secretion of neurotransmitters at the synaptic active zone is the primary event of interneuronal communication. This process is regulated by a highly orchestrated cycle of membrane trafficking within the presynaptic nerve terminal. Neurotransmitters are stored in synaptic vesicles. Depolarization of the nerve terminal by an action potential results in the opening of voltage-gated Ca^{2+} channels. The resulting influx of calcium ions triggers exocytosis which is a rapid fusion of the vesicles with the plasma membrane, releasing neurotransmitters into the synaptic cleft. Exocytosis involves the linking of intrinsic membrane proteins of the vesicle and the plasma membranes by specific docking and fusion, the SNARE proteins, at the active zone. The vesicle membranes are rapidly retrieved by endocytosis and the synaptic vesicles recycled within the nerve terminal. The nerve terminal is thus an autonomous unit that contains all elements required for synaptic vesicle exocytosis and proteins responsible for neurotransmitter biosynthesis and vesicular uptake. Once the neurotransmitter have been released, diffuses across the synaptic cleft and combines with receptor molecules in the membrane of the postsynaptic neuron producing, in a fraction millisecond, a large transient increased permeability to Na^+ and K^+ ions, provoking a net depolarization to about 100mV from the resting potential of about -60mV. This generates an action potential which spreads along the surface of the postsynaptic cell membrane which in turn may trigger Ca^{2+} movement to the cytosol in the synaptic terminal to generate a new response. Several proteins inside the post synaptic terminal are involved in this process. It is generally accepted that learning and memory result from structural and biochemical changes in specific synapses which alter neurotransmitter release and post synaptic action. These alterations are perceivable electrophysiologically as a long term potentiation (LTP),long term depression (LTD), or a combination of both.

UNITERMS: Synapses. Synaptic Vesicles. Synaptic Transmission. Long-Term Potentiation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - LLINÁS RR. A força da mente. **Veja 19 de agosto:** 102-109, 1998.

2 - KUFLLER SW; NICHOLLS JG & MARTIN AR. **From neuron to brain**, 2nd. ed. Sinauer Associates, Massachussets, 1984.

3 - LLINÁS RR. Calcium in synaptic transmission. In: **The biology of the brain: From neurons to networks**, Freeman WH Publishers, New York, Chap. 4, p. 53-69, 1988.

4 - SÜDHOF TC. The synaptic vesicle cicle: a cascade of protein-protein interactions. **Nature 375:** 645-653, 1995.

5 - SMITH SJ & AUGUSTINE GJ. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. **Trends Neurosci 11**: 458-464, 1988.

6 - MIKOSHIBA K; FUKUDA M; MOREIRA JE; LEWIS FMT; SUGIMORI M; NIINOBE M & LLINÁS RR. Role of the C_{2b} of synaptogmin in vesicular release and recycling as determined by specific antibosy injection into the squid giant synapse preterminal. **Proc Natl Acad Sci USA 92:** 10708-10712, 1995.

7 - FUKUDA M; MOREIRA JE; LEWIS FMT; SUGIMORI M; NIINOBE M; MIKOSHIBA K & LLINÁS RR. Role of the C_{2b} domain of synaptogamin in transmitter release as determined by specific antibody injection into the squid giant synapse preterminal. **Proc Natl Acad Sci USA 92:** 10703-10707, 1995.

8 - RÉGNIER-VIGOUROUX A; TOOZE AS & HUTTNER WB. Newly synthesized synaptofisin is transported to synaptic-like microvesicles via constitutive secretory vesicles and the plasma membrane. **EMBO J 10:** 3589-3601, 1991.

9 - VALE RD; REESE TS & SHEETZ MP. Identification of a novel force-generating protein kinesina involved in microtubulebosed motility. **Cell 42:** 39-50, 1985.

10 - EDWARDS RH. The transport of neurotransmitters into synaptic vesicles. **Curr Opin Neurobiol 2:** 586-594, 1992.

11 - CAMERON PL; SÜDHOF TC; JAHN R & DECAMILLI P. Colocalization of synaptofisin with transferrin receptors : implications for synaptic vesicle biogenesis. **J Cell Biol 115:** 151-164, 1991.

12 - JOHNSTON PA; CAMERON H; STUKENBROK R; JAHN R; CAMILLI PD & SÜDHOF TC. Synaptofisin is targed to similar microvesicles in CHO and PC12 cells. **EMBO J 8:** 2863-2872, 1989.

13 - LINSTEDT AD & KELLY RB. Endocitosis of the synaptic vesicle protein, sinaptofisin, requires the COOH-terminal tail. **J Physiol (Paris) 85:** 90-96, 1991.

14 - BEARER EL; DEBIRGIS JA; BODUER RA; KOO AW & REESE TS. Evidence for miosin motors on organelles in squid oxoplasm. **Proc Natl Acad Sci USA 90:** 11252-11256, 1993.

15 - CALAKOS N & SCHELLER RH. Sinaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion : a molecular description. **Physiol Rev 76**, 1-29, 1996.

16 - NELSON N. The vacuolar H^+-ATPase - one of the most fundamental ion pumps in nature. **J Exp Biol 172:** 19-27, 1992.

17 - BURNS ME & AUGUSTINE GJ. Sinaptic structure and function: dynamic organization yields architetural precision. **Cell 83:** 187-194, 1995.

18 - PARNAS H & PARNAS I. Neurotransmissor release at fast synapses. **J Membr Biol 142:** 267-279, 1994.

19 - BETZ WJ & BEWICK GS. Optical monitoring of neurotransmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. **J Physiol (Lond) 460:** 287-309, 1993.

20 - RYAN TA & SMITH SJ. Vesicle pool mobilization during action potential firing at hippocampal synapses. **Neuron 14:** 983-989, 1995.

21 - SCHWEIZER FE; BETZ H & AUGUSTINE GJ. From vesicle docking to endocytosis: Intermediate reactions of exocytosis. **Neuron 14:** 689-696, 1995.

22 - MARSAL J; RUIZ-MONTACELL B; BLASI J; MOREIRA JE; CONTRERAS D; SUGIMORI M & LLINAS RR. Block of transmitter release by botulinium C1 action on syntaxin at the squid giant synapse. **Proc Natl Acad Sci USA 94:** 14871-14876, 1997.

23 - SUGIMORI M; TONG C; FUKUDA M; MOREIRA JE; KOJIMA T; MIKOSHIBA K & LLINAS RR. Presynaptic injection of syntaxin-specific antibodies block transmission in the squid giant synapse. **Neuroscience 86:** 39-51, 1998.

24 - LLINÁS RR; SUGIMORI M; LANG EJ; MORITA M; FUKUDA M; NIINOBE M & MIKOSHIBA K . The inositol high-polyphosphate series block synaptic transmission by preventing vesicular fusion : a suid giant synapse. **Proc Natl Acad Sci USA 91:** 12990-12993, 1994.

25 - HATA Y; SLAUGHTER CA & SUDHOF TC. Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. **Nature 366:** 347-351, 1993.

26 - JOHNSTON PA & SÜDHOF TC. The multisubunuit structure of synaptophysin. Relationship between dissulfide bonding and homo-oligomerization. **J Biol Chem 265:** 8869-8873, 1990.

27 - GARCIA EP; GATTI E; BUTLER M; BURTON J & DE CAMILLI P. A rat brain Sec 1 homologue relatad to ROP and UNC 18 interacts with syntaxin. **Proc Natl Acad Sci USA 91:** 2003-2007, 1994.

28 - MCMAHON HT & SÜDHOF TC. Synaptic core complex of Synaptobrevin, Syntaxin, and SNAP25 forms high affinity - SNAP binding site. **J Biol Chem 270:** 2213-2217, 1995.

29 - WHITEHEART SW; ROSSNAGEL K; BUHROW SA; BRUNNER M; JAENICKE R & ROTHUW JE. N-ethilmaleimide-sensitive fusion protein : a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. **Cell Biol 126:** 945-954, 1994.

30 - DAVLETOV BA & SÜDHOF TC. Ca^{++}-dependent conformational change in synaptotagmin I. **J Biol Chem 269:** 28547-28550, 1994.

31 - GEPPERT M; GODA Y; HAMMER RE; LI C; ROSAHL TW; STEVENS CF & SÜDHOF TC. Synaptotagmin I: a major Ca^{++} sensor for transmitter release at a central synapse. **Cell 79:** 717-727, 1994.

32 - ZHANG JZ; DAVLETOV BA; SÜDHOF TC & ANDERSON RGW. Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP2: implications for membrane recycling. **Cell 78:** 751-760, 1994.

33 - WANG LH; SÜDHOF TC & ANDERSON RGW. The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin. **J Biol Chem 270:** 10079-10083, 1995.

34 - LLINÁS RR; SUGIMORI M & SILVER RB. The concept of calcium concentration microdomains in synaptic transmission. **Neuropharmacology 34**: 1443-1451, 1995.

35 - BLÖCHL A & THOENEN H. Characterization of nerve growth factor release from hippocampal neurons – evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway. **Eur J Neurosci 7:** 1220-1228, 1995.

36 - PENG YY. Ryanodine-sensitive component of calcium transients evoked nerve firing at presynaptic nerve terminals. **J Neurosci 16**, 6703-6712, 1996.

37 - SMITH AB & CUNNANE TC. Ryanodine-sensitive calcium stores involved in neurotransmitter release from sympathetic nerve terminals of the guinea pig. **J Physiol (Lond) 497:** 657-664, 1996.

38 - TSE FW; TSE E; HILLE B; HORSTMANN H & ALMERS W. Local Ca^{2+} release from internal stores controls exocytosis in pituitary gonodotrophs. **Neuron 18:** 121-132, 1997.

39 - BERRIDGE M. Neuronal calcium signaling. **Neuron 21:** 13-26, 1998.

40 - HSU SF; AUGUSTINE GJ & JACKSON MB. Adptation of Ca^{++} - triggered exocitosis in presynaptic terminals. **Neuron 17:** 501-512, 1996.

41 - DE ROBERTIS E. Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region. **Science 156:** 907-914, 1967.

42 - UEMURA T. The cadherin superfamily at the synapse: more members, more missions. **Cell 93**: 1095-1098, 1998.

43 - ROBERT S; FELDMAN JS & MEYER LF. **Principles of neuropsycopharmacology**. Ed. Sinauer Assoc., Massachussets, 1997.

44 - BLISS, TVP & COLLINGRIDGE, GL. A synaptic model of memory : long - term potentiation in the hippocampus. **Nature 361**: 31-39, 1993.

45 - MCNAUGHTON BL; DOUGLAS RM & GODDART GV. Synaptic enhancement in fascia dentata : cooperativity among coative afferents. **Brain Res 15**: 277-294, 1978.

46 - LEVY WB & STEWARD O. Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. **Brain Res 175:** 233-245, 1979.

47 - HEBB DO. **The organization of behavior**. Wiley, New York, 1949.

48 - MALENKA RC. Synaptic plasticity in the hippocampus : LTP and LTD. **Cell 78:** 535-538, 1994.

49 - DAVIES CH; STARKEY SJ; POZZA MF & COLLINGRIDGE GL. $GABA_b$ autoreceptors regulate the inducion of LTP. **Nature 349:** 609-611, 1991.

50 - COLLINGRIDGE GL; KEHLSJ & MCLENNAN HJ. Excitatory aminoacids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. **J Physiol (Lond) 334**: 36-46, 1983.

51 - BASHIR ZI; TAM B & COLLINGRIDGE GL. Activation of the glicine site in the NMDA receptor is necessary for the inducion of LTP. **Neurosci Lett 108:** 261-266,1990.

52 - LYNCH G; LARSON J; KELSO S; BARRIONUEVO G & SCHOTTLLER F. Intracellular injection of EGTA block inducion of hippocampal long-term potentiation. **Nature 305:** 719-721, 1983.

53 - MÜLLER M & CONNOR JA. Dendritic spines as individual neuronal compartments for sinaptic Ca^{++} responses. **Nature 354:** 73-76, 1991.

54 - SCKTOR TC; OSTEN P; VALSAMIS H; JIANG X; NAIK M & SUBLETTE E. Persistent activation of the isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiacion. **Proc Natl Acad Sci USA 90:** 8342-8346, 1993.

55 - CHETKOVIH DM;GRAY R; JOHNSTON D & SWEATT JD. N-Methil-D-aspartate receptor activation increases $_cAMP$ levels and voltage-gated Ca^{++} channel activity in area CA_1 of hippocampus **Proc Natl Acad Sci USA 88:** 6467-6471, 1991.

56 - SILVA AJ; STEVENS CF; TONEGAWA S & WANG Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in α-Calcium-Calmodulin kinase II mutant mice. **Science 257:** 201-206, 1992.

57 - LISMAN JE & GOLDRING MA. Feasibility of long-term storage of graded information by the Ca^{++}/Calmodulin-dependent protein kinase molecules of the postsynaptic density. **Proc Natl Acad Sci USA 85:** 5320-5324, 1988.

58 - REYMANN KG; DAVIES SN; MATTHIES H; KASE H & COLLINGRIDGE GL. Inibitors of calmodulin and protein Kinase C block different phases of hippocampal long-term potentiation. **Brain Res 461**:388-392, 1998.

59 - SOMMER B; KOLLER M; SPRENGEL R & SEEBURGH PH. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gate channels. **Cell 67**: 11-19, 1992.

60 - CHEN L & HUANG LYM. Protein kinase C reduces Mg^{++} block of NMDA-receptors channels as a mechanism of modulation. **Nature 356:** 521-523, 1992.

61 - MILER B; SARANTIS M; TRAYNELIS SF & ATTWELL D. Potentiation of the NMDA receptor currents by arachidonic acid. **Nature 355:** 722-725, 1992.

62 - MARKRAN H & SEGAL M. The inositol 1,4,5-trisphosphate pathway mediates cholinergic potentiation of rat hippocampal neuronal responses to NMDA. **J Phisiol (Lond) 447:** 513-533, 1992.

63 - MANABE T; RENNER P & NICOLL RA. Postsinaptic contribuition to long-term potentiacion revealed by the analysis of miniature synaptics currents. **Nature 355:** 50-55, 1992.

64 - MALGAROLI A & TSIEN RW. Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature sinaptic currents in cultured hippocampal neurons. **Nature 357:** 134-139, 1992.

65 - GARTHWAITE J; CHARLES SL & CHESS-WILLIANS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptor suggests role as intracellular messenger in the brain. **Nature 336:** 385-388, 1988.

66 - O'DELL TJ; HAWKINS RD; KANDEL ER & ARANCIO O. Tests of the roles of two diffusible substances in long term-potentiation : evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. **Proc Natl Acad Sci USA 88:** 11285-11289, 1991.

67 - HALEY JE; WILCOX GL & CHAPMAN PF. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **Neuron 8:** 211-216, 1992.

68 - BREDT SB & SNYDER SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron 8:** 3-11, 1992.

69 - DUMUIS A; SEBBEN M; HAYNES L; PIN JP & BOCKAERT J. NMDA receptors activates the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. **Nature 336:** 68-70, 1988.

70 - WILLIANS JH & BLISS TVP. An in vitro study of the effect of lipoxygenase and cyclo-oxigenase inhibitors of arachidoni acid on the indution and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. **Neurosci Lett 107:** 301-306, 1989.

71 - LYNCH MA & VOSS KL. Presynaptic changes in the long-term potentiation : elevated synaptosomal calcium concentration and basal phosphoinositide turnover in dentate gyrus. **J Neurochem 56:** 113-118, 1991.

72 - LYNCH MA & BLISS TVP. On the mechanism of enhanced release of [C^{14}]-glutamate in hippocampal long-term potentiation. **Brain Res 369:** 405-408, 1986.

73 - BEAR MF & MALENKA RC. Synaptic plasticity : LTP and LTD. **Curr Opinn Neurobiol 4:** 389-399, 1994.

74 - ITO M. Long-term depression. **Annu Rev Neurosci 12:** 85-102, 1989.

75 - LINDEN DJ. Long-term synaptic depression in the mammalian brain. **Neuron 12:** 457-472, 1994.

76 - DANIEL H; LEVENES C & CREPEL F. Cellular mechanism cerebellar LTD. **Trends Neurosci 21:** 401-407, 1998.

77 - MULKEY RM; HERRON CE & MALENKA RC. Na essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. **Science 261:** 1051-1055, 1993.

78 - MLKEY RM; ENDO S; SHENOLIKAR S & MALENKA RC. Involvement of a calciuneurin \inhibitor 1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. **Nature 369:** 486-488, 1994.

79 - INGEBRITSEN TS & COHEN P. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. **Science 221:** 331-338, 1983.

80 - BOLSHAKOV VY & SIEGELBAUM SA. Hippocampal long-term depression: arachidonic acid as a potentiation retrograde messenger. **Neuropharmacology 34:** 1581-1587, 1995.

81 - ROSS CA; DANOFF SK; SCHELL MJ; SNYDER SH & ULLRICH A. Three additional inositol 1,4,5-trisphosphate receptors : molecular cloning and differential localization in the brain and peripheral tissues. **Proc Natl Acad Sci USA 89:** 4265-4269, 1992.

82 - KUWAJIMA G; FUTATSUGI A; NIINOBE M; NAKANISHI S & MIKOSHIBA K. Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. **Neuron 9:** 1133-1142, 1992.

83 - CREPEL F; AUDINAT E; DANIEL H; HEMART N; JAILLARD D; ROSSIER J & LAMBOLEZ B. Cellular locus of the nitric oxide-synthase involved in cerebellar long-term depression induced by high external potassium concentration. **Neuropharmacology 33:** 1399-1405, 1994.

84 - BREDT DS; HWANG PM & SNYDER SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature 347:** 768-770, 1990.

85 - SOUTHMAN E; MORRIS R & GARTHWAITE J. Sources and targets of nitric oxide in rat cerebellum. **Neurosci Lett 137**: 241-244, 1992.

86 - ITO M & KARACHOT L. Protein kinases and phosphatase inhibitors mediating long-term desensitization of glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells. **Neurosci Res 14:** 27-38, 1992.

87 - LINDEN DJ. A protein synthesis-dependent late phase of cerebellar long-term depression. **Neuron 17:** 483-490, 1996.

88 - LINDEN DJ. Phospholipase A2 controls the induction of short-term versus long-term depression in the cerebellar Purkinje neuron in culture. **Neuron 15:** 1393-1401, 1995.

89 - CONQUET F; BASHIR ZI; DAVIES CH; DANIEL H; FERRAGUTI F; BORDI F; FRANZ-BACON K; REGGIANI A; MATARESE V & CONDE F. Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. **Nature 372**: 237-243, 1994.

90 - AIBA A; KANO M; CHEN C; STANTON ME; FOX GD; HERRUP K; ZWINGMAN TA& TONEGAWA S. Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. **Cell 79:** 377-388, 1994.

91 - CHEN C; KANO M; ABELIOVICH A; CHEN L; BAO S; KIM JJ; HASHIMOTO K; THOMPSON RF & TONEGAWA S. Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC gamma mutant mice. **Cell 83:** 1233-1242, 1995.

92 - LINDEN DJ & CONNOR JA. Long term synaptic depression. **Annu Rev Neurosci**. **18:** 319-357, 1995.

93 - LISMAN J. A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. **Proc Natl Acad Sci USA 86:** 9574-9578, 1989.

Recebido para publicação em 17/12/98

Aprovado para publicação em 01/06/99