Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

**Receptor A_{2a} de adenosina:
Estudo da modulação da liberação de
neurotransmissores em modelo *in vitro*.**

João Paulo de Pontes Matsumoto

São Paulo

2012

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

**Receptor A_{2a} de adenosina:
Estudo da modulação da liberação de
neurotransmissores em modelo *in vitro*.**

João Paulo de Pontes Matsumoto

Orientadora: Profa. Débora Rejane Fior-Chadi

Tese de Doutorado

Doutor em Ciências

Área de Especialização Fisiologia Geral

São Paulo

2012

Matsumoto, João Paulo de Pontes

Receptor A_{2a} de adenosina: Estudo da modulação da liberação de neurotransmissores em modelo *in vitro* / João Paulo de Pontes Matsumoto; orientadora Débora Rejane Fior-Chadi. --. São Paulo, 2012.

138p: f.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Receptor A_{2a} de Adenosina. 2. Neurotransmissão. 3. Neuromodulação. 4. Proteína cinase dependente de AMPc. 5. Sinapsina I. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título

Todas as opiniões expressas no presente documento são de exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Universidade de São Paulo pelos conteúdos apresentados.

Comissão Julgadora

Prof (a).

Prof (a).

Prof (a).

Prof (a).

Profa. Débora Rejane Fior-Chadi

O trabalho experimental descrito nessa tese foi realizado no Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob orientação da Profa. Débora Rejane Fior-Chadi.

Uma por vida.

E vida que segue.....

Para minha avó **YOSHI** (*in
memorian*) e mãe **EDEUZA**.
Com todo o meu amor,
admiração e respeito.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Débora pela orientação, por ter me acolhido em seu laboratório, por ter acreditado em minha capacidade, pelas oportunidades que me foram dadas, e o incentivo ao qual foi essencial para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos: Alexandre, Andreas, Beatriz, Camila, Chelo, Daiane, Daniel, Eduardo, Erica, Emerson, Karen, Marcos, Máisa, Maria, Marina, Merari, Miriam, Myna, Natália, Renato, Sandra, Sergio, Wânia os quais estiveram muito presentes durante o desenvolvimento deste projeto, seja ajudando nos experimentos e discussões científicas, como também pelas conversas informais que são extremamente necessárias durante os momentos de descontração, e principalmente por manter o nosso ambiente de trabalho sempre em harmonia.

Aos professores: Gero Miesenböck, José Cipolla, José Guilherme, Pedro Fernandes, Regina Markus e Zulma Ferreira.

Aos funcionários: Débora, Dilma, Dona Irani, Gisele, Eduardo, Erika, Helder, Jesus, Marcilene, Manoel, Ricardo, Roseli e Suzi aos quais são o *modus operandi* do instituto e merecem todo o meu agradecimento, respeito e carinho.

Especialmente a minha família: minha mãe querida Edeuza, minha vovozinha Yoshi (*in memorian*), meus irmãos José e Pedro, as minhas tias Mima, Te e No, minhas sobrinhas Letícia (Tsunami I) e Paola (Tsunami II) e meu primo Eduardo aos quais eu agradeço todos os dias por poder fazer parte dessa família tão feliz e harmoniosa.

As agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPESP.

MUITO OBRIGADO!!!!

INDICE

ABREVIACÕES.....	1
PALAVRAS CHAVES.....	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
1-INTRODUÇÃO.....	5
1.1-Neurotransmissão: posicionamento e conceitos históricos.....	5
1.2-Liberação de neurotransmissores.....	24
1.3-Neuromodulação.....	38
1.4-Adenosina: modulação e metamodulação da transmissão sináptica.....	44
1.5-Núcleo do trato solitário.....	51
1.6-Considerações.....	54
2-OBJETIVO.....	58
2.1-OBJETIVO GERAL.....	58
2.2-OBJETIVOS ESPEÍFICOS.....	58
3-MÉTODO.....	59
3.1-Animais.....	59
3.2-Cultura de células.....	59
3.3-Fármacos e soluções.....	61
3.4-Supereclipse sinapto-pHlorina.....	61
3.4.1-Amplificação e recuperação do SpH.....	61
3.4.2-Transfecção das culturas com o SpH.....	63
3.5-Dosagem do glutamato e noradrenalina na solução de trabalho.....	64
3.5.1-HPLC.....	64
3.5.2-Preparo da fase móvel	64
3.5.3-Preparo das curvas padrão.....	65
3.5.4-Derivatização do aminoácido glutamato.....	65
3.5.5-Curva temporal.....	66
3.5.6-Curva concentração-resposta.....	67
3.6-Ensaio enzimático.....	67
3.7-Análise da fosforilação da sinapsina através da técnica ICW.....	68
3.8-Análise dos dados.....	69
4-RESULTADO.....	70
4.1-Verificação do procedimento de recuperação do SpH.....	70
4.2-CGS induziu um aumento na fluorescência do SpH.....	72
4.3-Curva temporal	74
4.4-Curva concentração-resposta.....	77
4.5-ZM e H89 inibiram o aumento de GLU e NOR evocado pelo CGS.....	82

4.6-CGS aumentou os níveis da sinapsina I fosforilada.....	86
4.7-PKA medeia aumento na fosforilação da sinapsina I evocada pelo CGS.....	88
5-DISCUSSÃO.....	90
6-CONCLUSÃO.....	106
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

ABREVIACÕES

ABREVIações

Os nomes farmacológicos dos componentes, moléculas, receptores e áreas do sistema nervoso mencionados no texto estão descritos nessa lista, assim como todas as outras abreviações são exibidas na primeira vez que elas aparecerem no texto.

AMPc	Monofosfato de Adenosina cíclico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BFA	Brefeldina A
cAMP/GEF	proteína de troca do nucleotídio guanina regulada por AMPc
CGS21680*	Ácido benzeno propanoico hidrocloreídrico 4-[2-[[amino-9-(N-etil-β-D-ribofuranuronamidosil)-9H-punina-2-yl]amino]etil]
EPAC	Proteína de troca ativada diretamente pelo AMPc
GLU	Glutamato
H89	5-isoquinolinasulfonamida
NOR	Noradrenalina
NT	Neurotransmissor
NTS	Núcleo do trato solitário
NSF	Fator sensível ao N-etilmaleimida
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
rA_{2a}	Receptores A _{2a} de adenosina
RIM	Molécula de interação com a Rab3a
SNAP	Proteína de ligação ao NSF
SNAP25	Proteína associada ao sinaptossomo de 25kDa
SNARE	Receptores para a proteína solúvel de ligação ao fator N-etilmaleimida
SN	Sistema nervoso
SNC	Sistema nervoso central

SpH	Supereclipse sinapto-pHluorina
Sit	sinaptotagmina
VAMP	Proteína de membrana ligada à vesícula sináptica ou sinaptobrevina
VS	Vesícula sináptica
ZM241385†	Fenol 4-(2-[7-Amino- 2-(fúril) [1,2,4]triazolo [2,3- a] [1,3,5]triazina-5 ilamino]etil)
6Bnz	N6 benzoiladenosina-3',5'- monofosfato cíclico
8pCPT	Clorofeniltio-2'-O-metiladenosina-3'5'-monofosfato cíclico 4-(2-[7-Amino-2-(2-fúril)[1,2,4]triazolo[2,3- <i>a</i>][1,3,5]triazina-5-ilamino]etil)fenol

* nesta tese foi adotada a abreviação CGS ao invés da abreviação completa (CGS21680).

† nesta tese foi adotada a abreviação ZM ao invés da abreviação completa (ZM241385).

PALAVRAS CHAVES

Receptor A_{2a} de adenosina – Neurotransmissão – Neuromodulação –
Proteína cinase dependente de AMPc – Sinapsina I

RESUMO

A transmissão sináptica é essencial para o funcionamento do sistema nervoso. A neuromodulação permite regular esse processo de forma precisa. Um desses mecanismos modulatórios é a regulação da liberação de neurotransmissores. A adenosina é um importante modulador da transmissão sináptica. Além disso, a ativação do subtipo A_{2a} dos receptores para adenosina está envolvida com a facilitação da liberação de neurotransmissores no sistema nervoso central. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos modulatórios da ativação do receptor A_{2a} de adenosina sobre a liberação de neurotransmissores e sua via de sinalização intracelular em modelo *in vitro*. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com o agonista do receptor A_{2a} de adenosina aumentou a fluorescência do sensor ótico biosintético de liberação de vesícula sináptica (supereclipse sinapto-pHluorina), assim como os níveis de glutamato e noradrenalina. Além disso, foi demonstrado que o inibidor da proteína cinase dependente de AMPc aboliu o aumento nos níveis do glutamato e noradrenalina, tal como a fosforilação da proteína sináptica sinapsina I evocado pelo agonista do receptor A_{2a} de adenosina. Desta forma, nossos dados sugerem que a ativação do receptor A_{2a} de adenosina em cultura de células do bulbo de ratos Wistar modula a liberação de neurotransmissores e a fosforilação da sinapsina I, assim como a proteína cinase dependente do AMPc pode ser o *modus operandi* desse fenômeno modulatório.

ABSTRACT

Synaptic transmission is a *sine qua non* process for nervous system physiology. Such precise process is accomplished in part due to modulation of neurotransmitter release. Adenosine is a putative synaptic transmission modulator. Moreover, adenosine A_{2a} receptor facilitates neurotransmitter release in the Central Nervous System. The present study focuses on the modulation of neurotransmission by adenosine A_{2a} receptor and its intracellular signaling pathway in *in vitro* model. Here, we provided evidence that adenosine A_{2a} receptor agonist increases an optical biosynthetic sensor of synaptic vesicle release (supereclipt synapto-pHluorin), as well as glutamate and noradrenaline. Furthermore, it was demonstrated that cAMP-dependent protein kinase inhibitor abolished glutamate and norepinephrin increase, as well as synapsin I phosphorylation evoked by adenosine A_{2a} receptor agonist. Therefore, our data suggest that adenosine A_{2a} receptor activation modulates neurotransmitter release and synapsin I phosphorylation in cultured cells from medulla oblongata of Wistar rats, as well as cAMP-dependent protein kinase might be the *modus operandi* of this modulatory phenomenon.

INTRODUÇÃO

Neurotransmissão: posicionamento e conceitos históricos

“Os fatos permanecem e as teorias se vão”

Santiago Ramón y Cajal, 1894.

A inflexibilidade na terminologia enrijece o vocabulário com termos obsoletos que podem contrariar os achados científicos atuais. A terminologia deve evoluir em função das novas descobertas científicas com o propósito de fornecer significados fidedignos às estruturas e fenômenos. Definir um conceito científico exige prudência, uma vez que o conhecimento é um processo dinâmico que muda em função das novas descobertas. Portanto, o conceito deve ser estabelecido baseando-se na interpretação (posicionamento) dos resultados e principalmente através do consenso da comunidade científica.

Até o presente momento, talvez não haja na ciência um fenômeno fisiológico cuja construção do conceito tenha uma história tão rica em detalhes, eventos e personagens quanto a neurotransmissão. Por isso, não há como contemplar tudo e a todos, entretanto, sei que embora poucos nomes ficaram marcados na história do conceito, muitos outros cientistas e trabalhos (mesmos os de menor expressão) também contribuíram na elaboração desse conceito e antecipadamente, peço desculpas se alguns eventos ou personagens ficaram de fora desse capítulo.

Até recentemente, o fenômeno fisiológico denominado neurotransmissão química era classicamente definido como o efeito de certa substância química liberada das vesículas sinápticas dos neurônios pré-sinápticos depois da

despolarização da membrana mediante estímulos, que agiam em receptores específicos localizados nos neurônios pós-sinápticos e assim, produzindo uma resposta nesse neurônio. Neste capítulo, apresentarei eventos científicos e históricos que contribuíram para a construção de tal conceito, assim como na sua “nova” interpretação.

A história da compreensão do funcionamento do sistema nervoso é certamente tão longa quanto a própria história da humanidade. Embora, acredite-se que o primeiro registro documental que descreve o cérebro foi encontrado no papiro egípcio de Edwin Smith (1700 a.C.) (Feldman e Goodrich., 1999). Interessantemente, nesse papiro, que parece ser uma cópia de outro mais antigo, algumas injúrias no cérebro (dor de cabeça) se encontram descritas, assim como diversos tratamentos utilizando-se ervas encontram-se registrados.

Por muitos séculos, baseado em algumas observações anatômicas e principalmente filosóficas, que teorias sobre como o cérebro funcionava regiam os rumos da “neurociência antiga”, especialmente na Grécia antiga (berço dos principais filósofos) e posteriormente nas regiões dominadas pelo Império Romano. De fato, filósofos pré-socráticos, *e. g.*, Alcmeão (540-500 a.C.) e Demócrito (460-370 a.C.) já discutiam a presença de poros e canais no cérebro, além dos órgãos sensoriais (Sherrington., 1946). Enquanto, os pós-socráticos, tais como Hipócrates (460-370 a.C.) e Platão (427-347 a.C.) descreviam o cérebro como o centro das emoções, assim como Aristóteles (384-322 a.C.) em “*de anima*” (literalmente: sobre a alma), associava o centro psíquico da vida com a percepção

sensorial¹ (Crivellato e Ribatti, 2007). De forma que essas grandes mentes da humanidade estabeleceram importantes correlações entre essas duas áreas da ciência, as quais contribuíram na elaboração das próximas teorias sobre o conceito.

Entretanto, devemos a dois dos mais ilustres anatomistas da Universidade de Alexandria, Erasístrato (310-250 a.C.) e Herófilo (325-280 a.C.), o conceito do cérebro como o órgão da inteligência e uma parte anatômica integral do sistema nervoso, assim como o legado do pneumatismo, *i.e.*, o ar (*pneuma*), uma vez inalado, é transformado em *pneuma zootikon* no coração antes de chegar ao cérebro, onde se transforma em *pneuma psychicon* ou *spirit animalis* no latim (Rey., 1993).

Séculos mais tarde um romano de origem grega, Cláudio Galeno (131-200), modificou a teoria pneumática e estabeleceu a “doutrina ventricular” que se estendeu por vários séculos (Barbara e Clarac., 2011). De acordo com essa teoria, o cérebro funcionava como um sistema de natureza hidráulica chamado de pneumático-ventricular que bombeava através dos ventrículos laterais e o quarto ventrículo o “*spirit animalis*” para os nervos sensoriais e motores, uma vez que eles acreditavam que os nervos eram estruturas ocas, os quais forneciam as substâncias necessárias para a geração dos movimentos musculares (Swanson., 2007). Nesse contexto, a teoria do “*spirit animalis*” pode ser interpretada como a primeira abordagem histórica do conceito de neurotransmissores.

Durante muitos séculos, essa teoria foi tida como a verdade e muitos cientistas fundamentaram suas obras primas com base nesses conceitos.

¹ Embora Aristóteles acreditasse na teoria cardiocêntrica, isto é, o coração era a fonte da mente ou pensamentos.

Entretanto, apesar de se basearem nesses conceitos, trabalhos realizados no período da Renascença (entre os séculos XXIX e XXXI), *e.g.*, “*De humani corporis fabrica*” de Andreas Vasalius (1514-1564) detalhando a anatomia macroscópica do corpo humano e do cérebro, “*Traité de l’Homme*” de René Descartes (1596-1650) onde ele explica a mecânica do funcionamento do sistema nervoso e adota o termo corpúsculos cartesianos em vez de *pneuma*, assim como estabelece a doutrina “Cartesiana” (Bennett., 1999b) e “*Cerebri anatome*” de Thomas Willis (1621-1675), onde ele sugere que a “*psychicon pneuma*” era gerada na substância cinzenta cerebral e circulava através da substância branca dos nervos motores e sensoriais do tronco encefálico e da coluna espinal (Eadie., 2003; Swanson., 2007). Essas obras importantes ajudaram a construir os conceitos de transmissão e condução da informação entre os nervos e músculos naquela época.

Ainda sobre forte influência da doutrina do pneumatismo, John Thomas Hensing (1683-1726; *Cerebri examen chemicum*), Felice Fontana (1730-1805; *De irritabilitatis legibers nunc primus sancitis et de spiritum animmalium in movendis musculis inefficacia*) e Luigi Galvani (1737-1798; *De viribus electricitaris in motu musculari*) realizaram trabalhos que foram importantes no esclarecimento de alguns aspectos do conceito da neurotransmissão. Hensing realizou o primeiro estudo da química do cérebro onde ele detectou o fósforo como um de seus componentes (Piccolino., 1997; Bennett., 1999b), enquanto Fontana descreveu que os nervos eram compostos de finos cilindros contendo um fluido transparente e gelatinoso (Finger., 1994) e Galvani em seu clássico experimento com músculo de sapo identificou a eletricidade como o meio conduzido pelos nervos, chamando o meio de eletricidade animal (Galvani., 1791; apud Bresadola., 1998).

Interessantemente, no século seguinte, o legado de Galvani influenciou grandes descobertas no campo da eletrofisiologia. Carlos Matteucci proveu evidências instrumentais da existência da “eletricidade animal” sugerida por Galvani, quando conseguiu detectar correntes elétricas através do galvanômetro em superfícies musculares intactas e seccionadas de sapo ligadas em série (no experimento conhecido como “*frogs pile*” ou “*voltaic frog*”) (Moruzzi., 1996). Anos mais tarde, Emile du Bois-Reymond detectou eventos elétricos associados com a excitação do nervo e músculo provendo o primeiro registro instrumental do que ele chamou de “corrente de ação” ou “potencial de ação”. Nesses experimentos du Bois-Reymond demonstrou uma variação negativa na corrente do nervo e do músculo durante a estimulação (Schuetze., 1983)².

Contemporaneamente, outro segmento da ciência estava emergindo, a neuromorfologia, com o estabelecimento da “Teoria celular” que primeiramente foi descrita no Handbuch der Gewebelehre des Menschen de Rudolph Albert Von Kölliker (Kölliker., 1852, apud López-Munoz *et al.*, 2006). Embora o idealizador desse conceito tenha sido Rudolf Ludwing Carl Virchow (1821-1902) através de seus experimentos e de sua ilustre frase: “*omnis cellula e cellula*”, *i. e.*, cada célula viva é derivada de outra célula. Outros trabalhos de pesquisadores como Johann Evangelista Purkinje (1787-1869), Friedrich Gustav Jakob Henle (1809-1885), Matthias Jacob Schleiden (1804-1881) e Theodor Schwann (1817-1905) também contribuíram no estabelecimento da “Teoria Celular” (de Carlos e Borrel., 2007). De fato, as técnicas citohistológicas relatadas nesses trabalhos permitiu a

² Embora somente com os experimentos de Hodgkin, Huxley e Katz que os mecanismos da sinalização elétrica nos nervos foram elucidados. Ver adiante.

visualização das estruturas internas das células e em particular nas células do sistema nervoso.

Então, separadamente, importantes peças desse “quebra-cabeça”, perdome o trocadilho, foram sendo descobertas. Gabriel Gustav Valentin (1810-1863) demonstrou a primeira imagem microscópica da célula nervosa e dois anos depois, Robert Remak (1815-1865) descreveu os cilindros axiais (axônio) não mielinizados e suas conexões com o corpo celular (Fodstad., 2001). Em 1862, Wilhelm Friedrich Kühne (1837-1900) demonstrou como a terminação nervosa motora acoplava nas células musculares de sapos, chamando-a de “placa terminal” (Bennett., 1999b). Contudo, essas foram apenas algumas das peças do enorme quebra-cabeça, que ainda permanece incompleto, mesmos nos dias atuais.

Ainda nesse século, Josef Von Gerlach (1820-1896) propôs a “Teoria Reticular”. Essa teoria foi defendida por Camillo Golgi (1844-1926), porém com algumas modificações. Em particular, ele descreveu os prolongamentos nervosos como estruturas com funções tróficas e nutritivas. Na teoria reticular, acreditava-se que cada célula nervosa estava conectada a suas vizinhas por meio de prolongamentos protoplasmáticos, formando uma rede continua de neurônios, *i.e.*, retículo. Alguns anos mais tarde, essa teoria começou a ser contestada pelos trabalhos de Wilhelm His (1831-1904), Fridjof Nansen (1861-1930) e Auguste Henri Forel (1848-1931), nos quais eles constataram (cada um em seu respectivo trabalho) que a ligação direta protoplasmática não existia (Fodstad., 2001).

No entanto, foi Santiago Ramón y Cajal (1852-1934), considerado o “pai da neurociência moderna”, utilizando-se das técnicas estabelecida por Golgi chamada

de “*la reazione nera*” (*i.e.*, a reação negra) (Golgi., 1873; apud Kruger e Otis., 2007), que por meio dos seus experimentos sacramentou o colapso da teoria reticular (Sotelo., 2010).

Em seu ano de glória (1888), Cajal publicou dois artigos que mudaram a história da neurociência. No primeiro, ele observou que na linha molecular da substância cinzenta do cerebelo de aves, as terminações colaterais das células com forma de estrela cercavam os corpos das células de Purkinje como se fossem um “ninho” (pericelulares) e não formavam a rede difusa anastomosada proposta na teoria reticular (Cajal., 1888a; apud López-Muñoz *et al.*, 2006).

No outro trabalho, foi demonstrado que as fibras paralelas (dendritos) dos axônios do córtex cerebelar terminavam livremente, assim como as fibras nervosas ascendentes proeminentes das protuberâncias das células ganglionares alcançavam os corpos das células de Purkinje, estabelecendo a relação de “contingência” e não de “continuidade” (Cajal., 1888b; apud de Carlos e Borrel, 2007). Portanto, por meio desses trabalhos foi possível demonstrar que o sistema nervoso é composto de células individuais que se comunicam através de pequenas regiões de contato, estabelecendo assim, a base da “doutrina do neurônio”.

Cajal em seu trabalho “*Conexión general de los elementos nerviosos*” de 1889 postulou que a superfície de contato entre os neurônios possuía o aparato necessário para estabelecer a conexão entre essas células (Cajal., 1889; apud Sotelo., 2011). Interessantemente, anos mais tarde, Michael Foster (1836-1907) estava preparando a nova versão do livro texto de fisiologia (*A Text Book of Physiology by Foster*) (Foster., 1897; apud Tansey., 1997) e pediu a colaboração de

Charles Scott Sherrington (1857-1952) na elaboração do capítulo III sobre o sistema nervoso. Eles sentiram a necessidade de fornecer uma designação mais precisa para a região de contato entre as células do sistema nervoso. Sherrington sentiu dificuldade em achar um nome apropriado e, inicialmente, sugeriu “sindesmo”, de origem grega com o significado de “ligação” ou “tecido de ligação”. Sabendo dessa dificuldade, Foster resolveu consultar seu amigo professor Arthur Woollgar Verral (1851-1912), um especialista na língua grega, que sugeriu o termo “sinapse”³, *i.e.*, sin (junto) e hapteno (unir, fechar) (Todman., 2008). Fato este citado pelo próprio Sherrington em sua carta para John Fulton (1899-1960), em dezembro de 1937 (Fulton., 1938; apud Shepherd e Erulkar., 1997).

Embora Verral tenha sugerido o termo “sinapse”, foi Sherrington quem estabeleceu todo embasamento teórico para a criação do termo, assim como foi o primeiro a usá-lo no capítulo III do livro texto de fisiologia de Foster, *i. e.*, a primeira publicação científica que usou o termo sinapse e, portanto, é considerado o “pai” do conceito da “sinapse”. Além disso, Sherrington também contribuiu com a neurofisiologia moderna por meio do seu livro clássico *“The Integrative Action of the Nervous System”* de 1906, onde ele proveu dados do papel integrativo da transmissão nervosa em regiões do sistema nervoso como o tronco encefálico e cerebelo, assim como da existência de sinapses excitatórias e inibitórias (Shepherd e Erulkar., 1997).

A descoberta de mensageiros químicos responsáveis pela comunicação interneuronal foi um dos grandes feitos científicos do século XX. No entanto, alguns

³ O termo sinapse também se aplica a especializações celulares, as quais provem os meios para a transmissão da informação entre neurônios, *e.g.*, sinapse química e sinapse inibitória.

autores, no século anterior, já sugeriam, ao menos de maneira indireta, a existência da neurotransmissão química, *e.g.*, Claude Bernard (1813-1878) (Bernard., 1857; apud Conti., 2002) e seu pupilo Vulpian (1826-1887), em seus respectivos estudos com o curare, mostraram que esse veneno agia em “alguma” zona intermediária entre o nervo e o músculo, paralisando-o, embora o músculo ainda continuasse responsivo ao estímulo elétrico (Vulpian., 1866; apud Bennett., 1999a). Oswald Schmiedeberg (1838-1921) e Koppe também demonstraram que a estimulação elétrica do nervo vago e a administração exógena da muscarina tinham o mesmo efeito sobre o coração, e que esse efeito era antagonizado pela atropina (Schmiedeberg e Koppe., 1869, apud Muscholl., 1995).

Entretanto, o conceito da neurotransmissão química foi atribuída ao brilhante John Langley (1852-1925) através de seus clássicos experimentos com injeções de nicotina e curare no músculo esquelético, o qual lhe permitiu concluir que a nicotina e o curare agiam sobre uma “substância receptiva”⁴ no músculo e não nos terminais nervosos, estabelecendo, assim, o conceito de “neurotransmissão química” e do “receptor farmacológico” (Langley., 1905, 1906, 1907 e 1908; apud Bennett., 1999a).

É importante destacar que experimentos anteriores do próprio Langley realizados com extrato da medula adrenal, que possuía ações similares a aquelas induzidas pela estimulação do nervo simpático (Langley., 1901; apud Rubin., 2007), assim como os experimentos do seu aluno Thomas Elliott (1877-1961) com

⁴ Contemporaneamente, Paul Ehrlich desenvolveu sua própria teoria sobre receptor, que ele chamou de “quimiorreceptor”, assim como, também descobriu o arsênico Salvarsan, o primeiro agente quimioterápico usado no tratamento da sífilis (Maehle., 2009).

a adrenalina (naquela ocasião já descrito como o princípio ativo extraído da glândula adrenal por Jokich Takamine e patenteado pelo mesmo na Parke, Davis & Co) (Takamine., 1901; apud Aronson., 2000) (Elliott., 1904a, 1904b e 1905; apud Rubin., 2007), ajudaram-no a elaborar tais conceitos, os quais, posteriormente influenciaram as grandes descobertas do século XX.

É interessante, também, ressaltar que muitos outros trabalhos surgiram sob esse novo paradigma. Em 1906, Reid Hunt (1870-1948) e Réne Taveau (1876-?) sintetizaram a acetilcolina, que na época surgiu como um potencial transmissor químico, embora esse papel somente tenha sido confirmado décadas mais tarde (Hunt e Taveau., 1906; apud Bennett., 1999a). Dixon (1871-1931) descreveu que o nervo vago inibia a atividade do coração e sugeriu que este nervo continha a substância, que ele denominou de “pro-inibitória” (Dixon., 1907; apud Valenstein., 2002) . Nesse contexto, Henry Dale (1875-1968) analisou o efeito da acetilcolina em diversos órgãos inervados pelo nervo vago, demonstrando a importância fisiológica dessa molécula (Dale., 1914a e 1914b; apud Valenstein., 2002).

Alguns anos mais tarde, o conceito de neurotransmissão química foi finalmente consolidado através do simples, mas “genial”, experimento com coração de anfíbios, conduzido por Otto Loewi (1873-1961)⁵. Nesse experimento, ele isolou dois corações de sapos e colocou-os em um mesmo compartimento. Em seguida, estimulou o nervo vago de um deles, o qual, então, liberou uma substância

⁵ Segundo o próprio Loewi, a inspiração para o experimento seu clássico experimento com os corações de sapo surgiu em um sonho na noite anterior ao domingo de Páscoa de 1920, que ele descreveu como: “*The night before Easter Sunday of that year I awoke, turned on the light, and jotted down a few notes on a tiny slip of thin paper*”, Loewi., 1953.

(“*Vagustoff*” ou substância do vago) capaz de produzir o mesmo efeito observado no coração inervado, no outro coração (sem a inervação) (Loewy., 1921; apud Rubin., 2007).

Cinco anos depois, Loewi junto com Ernst Navratil (1902-1979) identificaram essa substância como sendo a acetilcolina (Loewi e Navratil., 1926a e 1926b; apud Bennett., 1999b) e por fim, Dale estabeleceu em mamíferos o papel da acetilcolina no sistema nervoso periférico (Dale e Duley., 1929; apud Tansey., 2006). Embora os trabalhos dos outros pesquisadores citados nesse parágrafo tenham contribuído para a elaboração do conceito de neurotransmissão química, foram os experimentos de Loewi e Dale que forneceram a prova para tal comprovação e, portanto, tiveram maior impacto nos rumos das pesquisas da neurotransmissão até os dias atuais.

Ainda no século XX, outros trabalhos importantes surgiram com foco na neurotransmissão química das fibras nervosas autonômicas e motoras (Feldberg e Gaddum., 1934; apud Bennett., 1999a; Canon e Rosenblueth., 1933; Eccles., 1934; Dale *et al.*, 1936; apud Rubin., 2007). Entretanto, um fato interessante foi o embate entre Dale e o também renomado John Eccles (1903-1997), brilhantemente chamado por Cook (1986) de “*The war of the soups and the sparks*” (*i.e.*, em português, “A guerra da sopa e da faísca”) (Valenstein., 2002)⁶. O foco da discussão era se a transmissão sináptica era química, como os farmacologistas defendiam, ou

⁶ Embora houvesse entre ambos uma divergência conceitual sobre a neurotransmissão, eles eram bons amigos e Eccles, sempre que descobria algo novo, enviava cartas descrevendo o ocorrido para Dale (Valenstein., 2002).

elétrica, como acreditavam os neurofisiologistas (em particular entre os nervos espinais e os músculos esqueléticos)⁷.

Eccles⁸ postulava que a neurotransmissão na junção neuromuscular era tão rápida que não podia ser mediada por transmissores químicos (Eccles., 1949; apud Valenstein., 2002). Entretanto, em 1951, através de seu experimento com microeletrodos nos motoneurônios espinais de gatos, Eccles pode concluir que a hiperpolarização observada em seus registros não poderia ser induzida eletricamente (Brock *et al.*, 1951; apud Valenstein., 2002) e, dois anos depois, seu grupo iniciou a série de experimentos que proveram evidências do papel inibitório da acetilcolina (Eccles *et al.*, 1953, 1954a,b e 1956; apud Burke., 2006), enfraquecendo assim, suas próprias convicções sobre a neurotransmissão elétrica como a única forma de transmissão no sistema nervoso. Então, anos mais tarde, ele passou a defender o conceito de que cada neurônio liberava somente um tipo de transmissor químico, chamando-o de “Princípio de Dale” (Eccles., 1964; apud Valenstein., 2002).

Interessantemente, outro campo da ciência, a eletrofisiologia, contribuiu para a compreensão dos conceitos envolvidos na propagação da informação nas células de modo geral e especialmente no sistema nervoso. Em 1939, Alan Hodgkin (1914-1998) e Andrew Huxley (1917-2012) demonstraram registros do potencial de ação nas fibras nervosas (Hodgkin e Huxley., 1939; apud Schwiening.,

⁷ É importante destacar que David Potter e Ed Furshpan em seus clássicos trabalhos (1959; Shepherd e Erulkar., 1997), proveram importantes evidências sobre a transmissão elétrica no sistema nervoso de lagostim, as quais serviram de base para a identificação das junções conectivas no sistema nervoso central e, portanto, na consolidação dessa outra forma de neurotransmissão.

⁸ Seus trabalhos contribuíram com a elucidação dos mecanismos envolvidos na gênese dos potenciais pós-sinápticos e consequentemente na compreensão da transmissão sináptica no sistema nervoso central (Eccles., 1964; apud Valenstein., 2002).

2012). Entretanto, somente após iniciarem sua colaboração com Bernard Katz (1911-2003), que havia desenvolvido a técnica de “*voltage-clamp*”, é que eles conseguiram demonstrar a propagação de potencial de ação em seus clássicos experimentos com o axônio gigante de lula (Hodgkin *et al.*, 1952; Hodgkin e Huxley., 1952a; Hodgkin e Huxley., 1952b; Hodgkin e Huxley., 1952c; Hodgkin e Huxley., 1952d; Hodgkin e Huxley., 1952e; apud Schwiening., 2012), estabelecendo, assim, evidências sobre a forma como a informação é transmitida através do axônio e, portanto, influenciando a compreensão de como se dá a neurotransmissão.

O avanço da microscopia eletrônica (1950s) permitiu a consolidação da teoria do neurônio, assim como contribuiu com novas evidências que reforçaram a teoria da neurotransmissão química. Pesquisadores como Sanford Luis Palay (1918-2002), George Emil Palade (1912-2008), Eduardo de Roberts (1913-1988) e Henry Stanley Bennett (1910-1983) demonstraram a presença de pequenas vesículas (20 – 60 nm de diâmetro) na região próxima das membranas dos neurônios que estavam nas margens da sinapse (Palade e Palay., 1954; de Robertis e Bennett., 1955; apud Heuser e Reese., 1977).

Além disso, José del Castillo (1920-2002) e Bernard Katz postularam que tais vesículas possuíam substâncias transmissoras no seu interior, as quais eram liberadas na sinapse através de exocitose e que esse conteúdo era o suficiente para produzir a resposta na célula receptora (hipótese da liberação quantal)⁹ (de

⁹ É importante destacar que nem sempre todo o conteúdo da VS é liberado durante a exocitose. Em alguns casos, não há a completa fusão da VS e, portanto, somente uma pequena quantidade de neurotransmissores é liberada. Esse mecanismo é denominado “*kiss-and-run*” (Chow *et al.*, 1992; Fesce *et al.*, 1994; Fernández-Peruchena *et al.*, 2005).

Casillo e Katz., 1954; apud Barrett e Stevens., 1972). Interessantemente, Paul Fatt e Katz descreveram em seus elegantes trabalhos como um sinal químico é convertido em um sinal elétrico no músculo esquelético (Fatt e Katz., 1951 e 1952).

Anos mais tarde, Katz e Ricardo Miledi (1927-) demonstraram que após a chegada do potencial de ação no terminal pré-sináptico, abriam-se canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem, os quais promoviam o aumento na condutância desse íon e que esse fenômeno está diretamente envolvido na liberação dos neurotransmissores (Katz e Miledi., 1965; apud Katz e Miledi., 1968). Por meio dessas descobertas importantes, foi possível compreender a relação de alguns mecanismos envolvidos na liberação e ação, dos neurotransmissores nas células pós-sinápticas.

Não restava mais dúvida quanto à existência da neurotransmissão química no sistema nervoso periférico. Entretanto, não havia dados convincentes que pudessem confirmar que ela também poderia ocorrer no sistema nervoso central (SNC). Então, após Ulf Von Euler (1905-1983) descrever a noradrenalina como principal neurotransmissor do nervo pós-ganglionar simpático, estabelecendo assim o conceito de “transmissor humoral” (Von Euler., 1946, apud Quirke., 2006), que outros pesquisadores como Arvid Carlsson (1923-) (utilizando-se da técnica de marcação histoquímica Falck-Hillarp) e Julius Axelrod (1912-2004), por meio de seus estudos sobre a biogênese, captação, armazenamento, liberação e inativação das monoaminas no cérebro (Carlsson *et al.*, 1958, 1962, 1964; Carlsson., 1959; Axelrod., 1954, 1959; Axelrod *et al.*, 1961; apud Rubin., 2007) conseguiram convencer a comunidade científica sobre a neurotransmissão química no SNC.

É importante ressaltar que antes das descobertas de Carlsson e Axelrod, já havia trabalhos descrevendo a presença de neurotransmissores como o glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA) no SNC (Awapara *et al.*, 1950; Roberts e Frankel., 1950; Curtis e Watkins., 1960; apud Krnjevic., 2010; Watkins e Jane., 2006). Embora somente décadas depois do seu descobrimento que seus papéis na neurotransmissão começaram a ser desvendados e, talvez, por isso, não foram decisivos na confirmação da neurotransmissão química no SNC.

Nessas últimas décadas, com o avanço dos métodos, novas evidências emergiram, as quais resultaram na quebra de diversos paradigmas da neurotransmissão e, portanto, contribuíram com a nova concepção sobre esse tipo de comunicação celular.

No início da década de 70, Geoffrey Burnstock (1972) iniciou a quebra de um grande paradigma da neurotransmissão do século passado, o “princípio de Dale”, quando demonstrou que o ATP era o transmissor químico utilizado pelo nervo inibitório autonômico NANC (abreviação do inglês, *Non-adrenergic and Non-cholinergic*), assim como, subsequentemente, o ATP foi identificado como um co-transmissor dos nervos simpáticos e parasimpáticos (Burnstock., 1976a). Então, baseado nessas evidências foi proposto a hipótese da “cotransmissão” (Burnstock., 1976b). Além disso, a descoberta de outros neurônios que também colibram outros neurotransmissores em diferentes regiões do SNC, *e.g.*, serotonina e glutamato (Johnson., 1994); ATP e GABA (Jo e Role., 2002); GABA e acetilcolina (Lee *et al.*, 2010) destacaram alguns aspectos fisiológicos desse fenômeno,

tornando-o um importante foco de estudo na compreensão da neurotransmissão *per se*, assim como, da neuromodulação¹⁰.

O conceito de transmissão sináptica (*i.e.*, a liberação de transmissores somente ocorre entre as junções sinápticas), como a única forma de transmissão entre neurônios no SNC, começou a enfraquecer a partir de trabalhos de Kjell Fuxe e Urban Ungerstedt, onde eles observaram a presença de fluorescência extraneuronal (catecolaminas e serotonina fluorescentes), ou seja, fora da sinapse dos neurônios estimulados (Ungerstedt *et al.*, 1969; Fuxe *et al.*, 1970a,b), assim como o fato de existir liberação não juncional de monoaminas através das chamadas “varicosidades” (Descarries *et al.*, 1975), sugerindo, desse modo, a existência de transmissão extrassináptica, denominada “transmissão por volume” por Agnati (1986). Portanto, a partir dessas descobertas, foi proposta a existência de dois importantes modos de comunicação intercelular no SNC, a transmissão sináptica (que Agnati chama de “*wiring transmission*”) e a transmissão por volume (Agnati *et al.*, 2010; Fuxe *et al.*, 2010).

A clássica visão de que somente os neurônios eram capazes de liberar transmissores e das células gliais como simples estruturas de suporte dos neurônios começou a mudar a partir da última década do século passado. A primeira evidência de que esses paradigmas estavam mudando foi a descoberta das variações na concentração do Ca²⁺ intracelular de astrócitos (Cornell-Bell *et al.*, 1990; Charles *et al.*, 1991). Além disso, outras características como a capacidade dos astrócitos em modular a transmissão sináptica glutamatérgica (Araque *et al.*,

¹⁰ O conceito de neuromodulação será abordado no capítulo 1.3.

1988a,b) e a identificar nestes, a expressão de diversos tipos de receptores para neurotransmissores destacaram diferentes funções daquelas anteriormente descritas para eles (Venance *et al.*, 1997; Burudi *et al.*, 1999). No entanto, a confirmação da capacidade dessas células em também liberar transmissores (*e.g.*, glutamato, ATP, D-serina) chamado de “sinapse tripartida” (Araque *et al.*, 1999), foi a descoberta mais importante que contribuiu com o fim desse paradigma, transformando assim, esse até então, mero “coadjuvante”, em um importante mecanismo no controle da transmissão sináptica no SNC e, portanto, da neurotransmissão¹¹.

Por muitos anos acreditou-se que a comunicação entre células do SN era polarizada, ou seja, uma transmissão unidirecional do sinal entre a célula pré-sináptica (transmissora) e a pós-sináptica (receptora). Segundo esse conceito, cada parte do neurônio era especializada em uma função como, por exemplo, os dendritos em receber a informação. A descoberta da sinalização retrógrada, a partir da qual mensageiros químicos são liberados por dendritos das células pós-sinápticas, como óxido nítrico, BDNF (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*), endocanabinóides e até mesmos neurotransmissores convencionais tais como GABA e glutamato, junto a células pré-sinápticas, levantou algumas questões sobre mais esse paradigma da neurotransmissão (Geffen *et al.*, 1976; Weisskopf *et al.*, 1993; Zilberter *et al.*, 1999).

É importante ressaltar que embora a sinalização retrógrada possua um papel neuromodulatório, esta é também uma forma de transmissão de informação

¹¹ É importante destacar que antes dessas sólidas evidências sobre a gliotransmissão, Sylvester Vizi já postulava a existência da ampla comunicação entre os neurônios e glia que podia ser observada como uma forma de transmissão não sináptica (Vizi, 1984).

que ocorre entre células do SN (base do conceito). Do mesmo modo, a similaridade com algumas características encontradas na neurotransmissão convencional devem ser considerada; como, por exemplo, o aparato para síntese dos mensageiros estar localizado na célula transmissora, assim como a liberação dos mediadores ser dependente de Ca^{2+} (Regehr *et al.*, 2009).

A descoberta de neurotransmissores “não convencionais”, como óxido nítrico, que não são armazenados em vesículas sinápticas e, portanto, não são liberados da maneira clássica (Garthwaite *et al.*, 1989; Bredt e Snyder., 1989 e 1990; apud Barañano *et al.*, 2001; Garthwaite., 2008), assim como a fosforilação/desfosforilação de certas proteínas localizadas no botão terminal pré-sináptico, as quais regulam a amplitude da liberação de neurotransmissores em resposta ao impulso nervoso (Castellicci *et al.*, 1980; Kaczmarek *et al.*, 1980; de Camilli *et al.*, 1983a,b)¹², também contribuíram na elaboração da nova interpretação desse fenômeno fisiológico, uma vez que puderam estabelecer novos paradigmas na neurotransmissão.

Por fim, considero que apesar das novas descobertas discutidas no final desse capítulo parecem heréticas no contexto da clássica compreensão desse fenômeno, elas são simplesmente consequência do progresso científico, o qual passou por brilhantes cientistas e diferentes fases que contribuíram na construção desse conceito. Além disso, para a construção do conceito da neurotransmissão é fundamental considerarmos duas importantes características desse tipo de comunicação: a pluralidade e a plasticidade de mecanismos utilizados para a

¹² É importante ressaltar que os trabalhos do próprio Greengard e Kuo uma década antes foram os primeiros indícios de que tal fenômeno ocorria (Greengard e Kuo., 1970; Kuo e Greengard., 1970).

transmissão da informação no sistema nervoso. Portanto, não há como definirmos um fenômeno tão abrangente e dinâmico como apenas uma parte desse processo. Por isso, considerando os pontos abordados até o presente momento, interpreto o fenômeno fisiológico chamado de “neurotransmissão” da forma mais simples e talvez, fidedigna, como a transferência de informação entre células do sistema nervoso ou entre o nervo com sua célula efetora por meio de diversos mecanismos que atendem as complexas demandas necessárias para a realização desse tipo de comunicação celular.

Liberação de neurotransmissores

A neurotransmissão química depende da regulação da síntese e liberação dos neurotransmissores. No caso de moléculas gasosas e lipofílicas, *e.g.*, NO e endocanabinóides que conseguem penetrar as membranas plasmáticas, a liberação é regulada pela síntese. Por outro lado, moléculas hidrofílicas são armazenadas em vesículas e liberadas através de exocitose, *e.g.*, glutamato, acetilcolina, dopamina e vasopressina. Além disso, a liberação das vesículas sinápticas contendo os neurotransmissores na fenda sináptica é um processo que depende de uma precisa sequência de eventos que inclui desde a liberação do citoesqueleto, tráfego até a zona ativa, ancoramento e fusão da VS. Essas etapas são mediadas por diversas moléculas, entre elas dezenas de proteínas que podem ser moduladas por outras proteínas reguladoras, *e.g.*, cinases, fosfatases, chaperonas (Jahn e Scheller, 2006).

Em resumo, o ciclo de liberação da vesícula sináptica ocorre em algumas etapas: 1) NTs são transportados ativamente para o interior da VS; 2) VS se posiciona na zona ativa; 3) ocorre o ancoramento da VS na zona ativa; 4) essa VS se torna “pronta” para liberação, ou seja, receptiva ao íon Ca^{2+} ; 5) o Ca^{2+} desencadeia a fusão e a abertura do poro; 6) depois da fusão, acontece a endocitose e reciclagem da VS.

A vesícula sináptica (VS) é uma pequena organela (~ 40 - 80 nm de diâmetro) composta de proteínas e fosfolipídios (40% fosfatidilcolina, 32% fosfatidiletanolamina, 12% fosfatidilserina, 5 % fosfatidilinositol, 10% colesterol) que armazena os neurotransmissores (Benfenati *et al.*, 1989). As vesículas

pequenas liberam ~ 4700 moléculas transmissoras em um tempo constante de 260µs por evento, enquanto as grandes ~ 80.000 em 1,3 ms (Bruns e Jahn., 1995).

O transporte dos neurotransmissores para o interior da VS é mediado por transportadores vesiculares que determinam a quantidade dessas moléculas na vesícula. Evidências sugerem que o funcionamento desses transportadores é regulado pelo gradiente eletroquímico do íon hidrogênio, que é gerado principalmente através da H⁺ ATPase tipo-vacuolar uma vez que esses transportadores são do tipo antiporte, cujo um dos solutos é esse próton. Além disso, em alguns casos, *e.g.*, das vesículas que armazenam o glutamato, outros íons (Cl⁻) também influenciam no transporte do neurotransmissor (Edwards., 2007).

A localização da VS no botão pré-sináptico pode definir se ela vai ser liberada ou não. As VSs se agrupam em três diferentes regiões nos botões terminais formando reservatórios que são nomeados conforme sua localização e característica. O localizado na zona ativa¹³ é chamado de “reservatório pronto para liberação” (~1% do total de VS), logo acima está o “reservatório reciclado” (~5-20%) e mais distante da zona ativa está o “reservatório de reserva” (~80-90%) (Denker e Rizzoli., 2010).

A quantidade de vesículas sinápticas em cada sinapse pode variar muito, *e.g.*, na junção neuromuscular pode alcançar 500.000, enquanto, no SNC são encontradas entre 200 e 300 vesículas (Rizzoli e Betz., 2005). Além disso, a fusão da VS pode ser total, liberando todo seu conteúdo, chamada de “*kiss and stay*” ou

¹³ A zona ativa possui a forma similar à um disco (0,2-0,5µm de diâmetro) (Södhof., 2012).

parcial e mais rápida com a liberação de pouco neurotransmissores, denominada de “*kiss and run*” (He e Wu., 2007).

A sinapsina foi a primeira proteína sináptica identificada em uma série de trabalhos publicados pelo grupo de Paul Greengard (Greengard e Kuo., 1970; Jonhson *et al.*, 1972; Ueda *et al.*, 1973). Em mamíferos, são expressos três isoformas de sinapsina (I, II e III). É sabido que a isoforma I da sinapsina é uma fosfoproteína que liga a VS aos filamentos de actina do citoesqueleto em seu estado desfosforilado.

Inicialmente, a sinapsina foi descrita como um substrato abundante para a PKA (Greengard *et al.*, 1987), no entanto, atualmente, são conhecidos nove sítios para fosforilação, que são reguladas por outras cinases como a proteína cinase do tipo II dependente do complexo Ca^{2+} /calmodulina (Stefani *et al.*, 1997; Jovanovic *et al.*, 1996) e cinase regulada por sinal extracelular (Erk1/2, do inglês *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*) (Nielander *et al.*, 1997; Hosaka *et al.*, 1999).

Interessantemente, nas sinapses do SNC são encontradas oito moléculas de sinapsina por VS (Takamori *et al.*, 2006) e a deleção do gene da sinapsina I em camundongos resulta na diminuição da densidade das VS na zona ativa (Greengard *et al.*, 1993) sugerindo que esta molécula possui um importante papel na formação dos reservatórios de VS no botão terminal dos neurônios e, portanto, na disponibilidade das VS prontas para a liberação.

Dois fenômenos nos neurônios pré-sinápticos estão diretamente envolvidos na liberação das VSs. A chegada do potencial de ação no botão terminal e a abertura dos canais de cálcio devidamente localizados na zona ativa. O papel do

íon cálcio na liberação de neurotransmissores vem sendo extensivamente estudado desde o trabalho pioneiro de Katz e Miledi (1968).

Uma densa quantidade de canais de Ca^{2+} é encontrado bem próximo da região de ancoramento das VS ($\sim 100 \text{ nm}$) na zona ativa (Schneggenburger *et al.*, 2012). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que após a chegada do potencial de ação, ocorre a abertura desses canais e o influxo desse íon induz a fusão das VS de forma rápida e precisa ($\sim 100 \mu\text{s}$) (Sabattini e Regehr, 1996).

Além disso, são conhecidas três formas de exocitose de VS dependente de Ca^{2+} : a sincronizada imediatamente após o potencial de ação ($< 2 \text{ ms}$), a liberação espontânea miniatura, *i.e.*, independente do potencial de ação (descrita por Fatt e Katz em 1952), e a assíncrona (não sincronizada) que ocorre após um atraso ou término de um estímulo.

É proposto que a liberação espontânea ($< 100\mu\text{s}$), representa a atividade de “fundo” do terminal nervoso (estima-se que esse tipo de liberação ocorra a cada 3 horas em sinapses excitatórias e a cada 3 minutos em inibitórias), enquanto a assíncrona é quase indetectável em condições fisiológicas (Pang e Södhof, 2010). No entanto, quando há a deleção do gene que expressa a proteína chamada de sinaptotagmina, esse tipo de liberação se torna evidente (Geppert *et al.*, 1994), sugerindo um importante papel dessa proteína no controle da liberação sincronizada de neurotransmissores dependente de Ca^{2+} .

Trabalhos do grupo do Södhof identificaram a proteína sinaptotagmina (Sit) no início da última década do século passado (Perin *et al.*, 1990 e 1991; Geppert *et al.*, 1991). A Sit é uma família de proteínas de membranas com um duplo terminal

carboxil com domínio para o Ca^{2+} (domínio C2) (Chapman., 2008). Em mamíferos, são expressas 16 isoformas de Sit das quais 8 se ligam ao Ca^{2+} com diferentes níveis de afinidade (Sit1-3, Sit5-7, Sit9 e Sit10).

A sinaptotagmina está ancorada na membrana da vesícula e interage de maneira dependente de Ca^{2+} com o complexo SNARE¹⁴ na liberação sincronizada de neurotransmissores (Geppert *et al.*, 1994; Fernández-Chacón *et al.*, 2001; Rickman *et al.*, 2006; Martens *et al.*, 2007). Outras evidências postulam que a ligação do Ca^{2+} na Sit reverteria a ação da complexina¹⁵ permitindo que a fusão da VS se complete (Södhof e Rothman., 2009). Além disso, em estudo recente, Young, Jr e Neher (2010) demonstraram que mutação na sinaptotagmina 2 (R399,400Q) reduziu a liberação espontânea sem mudar a intrínseca sensibilidade dessa proteína ao Ca^{2+} . Desta forma, isso sugere que além da função de sensor de Ca^{2+} na liberação de neurotransmissores a sinaptotagmina também está envolvida no ajuste do posicionamento da VS antes da liberação.

A fusão entre as membranas da VS e do botão pré-sináptico é um processo fundamental na liberação de neurotransmissores. As primeiras evidências que surgiram sobre a influência de algumas moléculas no processo fusogênico foi a descoberta de formas mutantes de proteínas envolvidas em processos secretórios sensíveis a temperatura em *Saccharomyces cerevisiae* que Novick e coautores (1980) chamaram de “sec mutante”. A partir desse experimento foi possível caracterizar mais tipos de sec, *e.g.*, sec17 e 18 e descrever suas funções nesse

¹⁴ SNARE é a abreviação em inglês para *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*. Esse tema será abordado mais adiante nesse capítulo.

¹⁵ A função da proteína complexina será abordada ainda nesse capítulo.

processo secretório (Eakle *et al.*, 1988), servindo de modelo para os estudos de proteínas homólogas em outros organismos.

Interessantemente, Wilson e coautores (1989) identificaram uma proteína equivalente a sec18 em mamíferos, que podia ser inibida pelo reagente N-etilmaleimida e por isso, foi chamada de fator sensível à N-etilmaleimida (NSF, do inglês *N-ethylmaleimide-sensitive factor*). A NSF é um homohexâmero, membro da família de proteínas AAA⁺, *i.e.*, ATPase associada a diversas atividades celulares que utiliza da hidrólise do ATP para alterar a conformação de um substrato proteico (Fleming *et al.*, 1998; Hanson e Whiteheart, 2005). A atividade ATPásica intrínseca da NSF é baixa (Tagaya *et al.*, 1993), por outro lado, quando ela interage com a proteína SNAP¹⁶ essa atividade é estimulada (Morgan *et al.*, 1994), assim como ela alcança sua máxima atividade ATPásica quando interage com ambas SNAP e complexo SNARE ao mesmo tempo (Matveeva e Whiteheart, 1998). É proposto que a NSF possui um importante papel na desmontagem do complexo SNAP-SNARE.

Além disso, é sabido que a SNAP e complexo SNARE interagem, formando o complexo SNAP-SNARE, nesse momento, esse complexo recruta o NSF que se torna disponível à ligação do ATP. Uma vez ligado, o complexo estimula a atividade ATPásica da NSF que promove mudanças conformacionais nessa proteína, a qual age como catalisador da desmontagem do complexo SNAP-SNARE (Zhao *et al.*, 2012).

¹⁶ SNAP é a abreviação da palavra em inglês, *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor protein*.

Em seguida, outra proteína equivalente a uma sec de levedura, desta vez a sec 17, foi descoberta e denominada de SNAP, uma vez que essa proteína é solúvel e se liga à NSF. Em mamíferos, existem três tipos de SNAPs: α , β e γ , sendo a forma α -SNAP a mais abundante (Clary *et al.*, 1990). Primeiramente, foi atribuído a ela o papel de cofator no processo de desmontagem do complexo SNARE devido a NSF não se ligar diretamente ao complexo (Söllner *et al.*, 1993a). No entanto, Barszczewski e coautores (2008) demonstraram que a α -SNAP pode se ligar a proteína syntaxina1 no estado livre inibindo a formação do complexo SNARE, sugerindo que a α -SNAP possui outra função independente do seu papel como cofator para a NSF.

Um passo crucial para o entendimento dos mecanismos da fusão de membranas e, portanto, no processo fusogênico da VS, foi a caracterização das proteínas de membranas envolvidas nesse fenômeno. Entre os anos de 1988 à 1993, trabalhos importantes possibilitaram a identificação dessas proteínas. A primeira proteína identificada foi a de membrana associada a vesícula (VAMP, do inglês *vesicle-associated membrane protein*) em peixe (*Torpedo*) (Trimble *et al.*, 1988), assim como, um ano depois, descobriram proteínas homólogas em mamíferos e *Drosophila*, porém chamadas de sinaptobrevina (Södhof *et al.*, 1989). Interessantemente, trabalhos demonstraram que a toxina botulínica (BoNT/B) e tetânica eram capazes de bloquear a neurotransmissão através da clivagem da VAMP/sinaptobrevina (Schiavo *et al.*, 1992; Link *et al.*, 1992), sugerindo que essa proteína participava do processo de exocitose de neurotransmissores.

Na mesma época, foi identificada uma proteína que se concentrava na membrana plasmática na região sináptica e postulou-se ter uma função no

ancoramento das VS, essa proteína foi nomeada de syntaxina (Bennett *et al.*, 1992). Outra proteína descrita foi a associada ao sinaptossomo de 25kDa ou SNAP-25, do inglês *25kDa synaptosome-associated protein* (Oyler *et al.*, 1989). A SNAP-25 mostrou ser o alvo específico para a toxina botulínica A (BoNT/A) (Blasi *et al.*, 1993), sugerindo assim, ser também um componente do processo de liberação de neurotransmissores.

No entanto, o principal avanço na compreensão dos mecanismos envolvidos na fusão da VS ocorreu em 1993 quando James Rothman, Richard Scheller e seus associados publicaram dois artigos que propuseram a “hipótese SNARE”, *i.e.*, cada vesícula, tem sua própria proteína de fusão (v-SNARE) a qual interage com outra proteína específica na membrana alvo (t-SNARE), essa interação ancora a vesícula na membrana e forma o complexo SNARE, que por sua vez precisa das proteínas NSF e SNAP para desmontar.

Nesses trabalhos foram demonstrados que o NSF e a SNAP são componentes universais do aparato fusogênico, assim como foi possível relacionar e descrever os alvos específicos para essas moléculas que foram chamados de receptores para SNAP ou SNARE, sendo esses receptores a VAMP, syntaxina e SNAP-25 (Söllner *et al.*, 1993a,b). Interessantemente, uma característica em comum desses receptores é a presença de um sítio “motivo” composto por uma sequência de 70 resíduos de aminoácidos que está envolvida diretamente com a formação do complexo SNARE, uma vez que esses sítios motivos juntos, de forma espontânea, se associam para formar um complexo helicoidal de grande estabilidade (Fasshauer., 2003).

A VAMP/sinaptobrevina é uma pequena SNARE (13 kDa) composta de um N-terminal curto (27 resíduos de aminoácidos) rico em prolina, da sequência motivo e um C-terminal na região transmembrânica da VS (de Haro *et al.*, 2004). No SNC de mamíferos são expressos duas isoformas a VAMP 1 e 2, sendo a segunda isoforma a mais abundante de todas as proteínas da VS, estima-se que há 70 cópias por VS, ou seja, aproximadamente 9% de todas as proteínas encontradas na VS¹⁷ (Takamori *et al.*, 2006). Em camundongos, a deleção da VAMP2 leva a morte pós-natal e causa quase que a completa perda da liberação de neurotransmissores espontânea e evocada (Schoch *et al.*, 2001). Além disso, em cultura de células do hipocampo de camundongos *knockout* para VAMP2, a ausência dessa proteína modifica a forma e o tamanho das VS (Deák *et al.*, 2004). De modo que é sugerido que a VAMP possui um importante papel nos processos de endocitose e exocitose rápida da VS.

A SNAP-25 é uma proteína integral da membrana plasmática expressa em neurônios e células secretoras, com duas isoformas SNAP-25a e SNAP-25b (Bark e Wilson., 1994). A SNAP-25 contém um domínio rico em resíduos de cisteína palmitilizado que é importante para sua ligação com a membrana (Gonzalo e Linder., 1998). Na formação do complexo SNARE, a SNAP-25 contribui com duas das quatro α -hélices necessárias (Södhof., 2004), assim como ela também interage com a sinaptotagmina I (Schiavo *et al.*, 1997) e canais de Ca^{2+} dependentes de

¹⁷ Nesse mesmo trabalho Takamori e colaboradores encontraram também duas cópias da isoforma 4 (VAMP 4). Em recente estudo, Raingo e coautores (2012) postulam que a VAMP 4 direciona a VS para uma região que seletivamente mantém a liberação de neurotransmissores assíncrona nas sinapses inibitórias dos interneurônios.

voltagem demonstrando ser essencial no processo fusogênico dependente de Ca^{2+} (Jarvis e Zamponi., 2005).

Além disso, o C-terminal da SNAP-25 é alvo das subunidades β e γ da proteína G, a qual induz uma inibição pré-sináptica (Gerachshenko *et al.*, 2005). Portanto, o papel da SNAP-25 na formação do complexo helicoidal fusogênico e suas múltiplas interações, sugerem uma importante função dessa proteína no processo de fusão da VS.

São encontrados em células de mamíferos, quatro das quinze isoformas de syntaxina (Stx), sendo estas as isoformas de 1 a 4. No botão terminal pré-sináptico a isoforma 1 medeia a exocitose da VS, assim como ela é composta de um domínio N-terminal em forma de α -hélice (domínio H_{abc}), a região motivo SNARE localizada no C-terminal e a região transmembrânica (Bennett *et al.*, 1992). Interessantemente, a syntaxina 1 possui duas conformações: fora do complexo SNARE, na posição “fechada” (Dulubova *et al.*, 1999), o qual o domínio H_{abc} se dobra em direção da região motivo SNARE e a posição “aberta” quando ela está ligada ao complexo SNARE (Sutton *et al.*, 1998). Essa característica peculiar demonstra que a Stx realiza uma função regulatória importante na formação do complexo SNARE.

A proteína unc-18 (do inglês, *uncoordinated-18*) da *Caenorhabditis elegans* (similar a sec1), também encontradas em mamíferos e chamada de Munc18 (do inglês, *mammilian uncoordinated-18*) são conhecida como as proteínas Sec1/Munc18 (SM) (Hata *et al.*, 1993). As SMs são polipeptídios de 70 kDa (~ 600 aminoácidos) altamente conservados entre as espécies que agem como

reguladores do processo fusogênico através de sua interação na formação do complexo SNARE.

Alguns trabalhos sugerem que a Munc18 age como chaperona da syntaxina-1 favorecendo a formação do complexo SNARE (Martinez-Arca *et al.*, 2003; Medine *et al.*, 2007). Por outro lado, outros trabalhos demonstraram que ela pode se ligar a syntaxina-1 no estado “fechado”, a qual impede a formação do complexo SNARE (Dulubova *et al.*, 2007; Burkhardt *et al.*, 2008). Interessantemente, camundongos *knockout* para o gene que expressa a Munc-18 abolem totalmente a liberação de neurotransmissores (Verhage *et al.*, 2000).

Atualmente, são propostos três tipos de interações da Munc18 com a syntaxina: na conformação “fechada” (modo I) e no N-terminal (modo II e III), as quais dependem se ela se encontra sozinha ou no complexo SNARE respectivamente (Burgoyne e Morgan., 2007). Essas evidências sugerem funções regulatórias importantes da Munc18 no processo de ancoramento da VS, assim como na fusão das membranas.

O mecanismo fusogênico da VS requer a formação do complexo SNARE (Södhof e Rothman., 2009). A interação entre as regiões motivo das v- e t-SNAREs, forma um heterotrímero extremamente estável composto de quatro α -hélices alinhadas paralelamente, nos quais a VAMP e syntaxina contribuem com uma hélice cada e a SNAP-25 com duas, denominado de trans-SNARE ou SNAREpin (Sutton *et al.*, 1998).

A trans-SNARE forma o feixe helicoidal que tem início no N-terminal e segue rumo ao C-terminal ancorado na membrana proximal da VS, a qual exerce a força

necessária para a aproximação das membranas e a fusão, conhecido como modelo “zíper” (Pobbati *et al.*, 2006). Nesse processo, cada SNAREpin gera aproximadamente $35 k_B T$ de energia (equivalente à 20 kcal/mol)¹⁸ (Li *et al.*, 2007). Após a fusão, essa força é dissipada e a interação entre as α -hélices do complexo torna-se de baixa energia e essa fase é conhecida como cis-SNARE. Embora as interações entre as proteínas SNARE nesse estado estão fracas, somente com a ligação da α -SNAP e NSF que o complexo cis-SNARE é desmontado (Söllner *et al.*, 1993a).

Devido as características energéticas da SNAREpin e estudos em modelos fusogênicos reduzidos (lipossomos) é postulado que constitutivamente a fusão ocorra espontaneamente na ausência de proteínas adicionais que impeçam esse processo (Bogaart *et al.*, 2010). No entanto, é importante destacar que o acoramentos da VS e a secreção dependente de Ca^{2+} são regulados negativamente e positivamente, assim como espacialmente e temporalmente por múltiplas proteínas como, por exemplo, a sec1/mun18 e sinaptotagmina (Södhof e Rothman., 2009).

Em adição, outra proteína que emerge como potencial molécula reguladora da fusão da VS é a complexina, a qual é composta de quatro domínios, duas α -hélices e as sequências N- e C-terminais (Maximov *et al.*, 2009). A “hélice central” (próximo ao C-terminal) é o principal sítio de ligação da complexina com o

¹⁸ $k_B T$ é uma constante física de energia livre por molécula, no qual k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. A energia necessária para que ocorra a fusão é de 50 à 100 $k_B T$ (Cohen e Melikyan., 2004). Portanto, estima-se que três ou mais SNAREpin fornecem a energia suficiente para a fusão (Hua e Scheller., 2001).

complexo SNARE, já os N- e C-terminais são responsáveis por promover a fusão da VS, enquanto a “hélice acessória” inibe a fusão (Weninger., 2011).

A interação do N-terminal da complexina com o C-terminal do SNAREpin promove estabilização do complexo e a fusão da VS (Xue *et al.*, 2007). Por outro lado, ela também compete com a sinaptotagmina pela ligação com o complexo SNARE na liberação dependente de Ca^{2+} impedindo a fusão (Tang *et al.*, 2006). Esses múltiplos domínios regulatórios e suas interações indicam que a complexina pode facilitar e inibir a liberação de neurotransmissores, provavelmente agindo em diferentes momentos da exocitose, tais como o ancoramento e fusão da VS.

Embora ainda haja muita controvérsia a respeito dos aparatos e mecanismos envolvidos na liberação de neurotransmissores, os dados obtidos nessas últimas décadas proveram avanços significativos na compreensão desse fenômeno, assim como seus resultados contraditórios geraram mais questões a serem respondidas.

De fato, a cada ano, novas funções e mais moléculas são atribuídas à esse processo fisiológico, *e.g.*, α -sinucleína, ELKS (também conhecida com proteína de interação com a Rab6), molécula de interação com a Rab3a (RIM, do inglês *Rab3a-interacting molecule*) e a proteína com um duplo domínio C2 para o Ca^{2+} (Doc2, do inglês *double C2 domain protein*) (Burré *et al.*, 2010; Kaeser *et al.*, 2009; Mittelstaedt *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2011). Em adição, a diversidade das formas de sinapses e suas propriedades, assim como as dezenas de isoformas das proteínas envolvidas na liberação de neurotransmissores e suas múltiplas funções, dificulta a

formação do consenso, de modo que ainda estamos muito longe de desvendarmos essa importante fronteira da neurobiologia.

Sobretudo, por uma questão de espaço, o autor limitou-se a destacar alguns dos pontos fundamentais do conceito e seus eventos históricos, os quais se espera permitir, ao menos de forma resumida, a compreensão dos mecanismos envolvidos na liberação de neurotransmissores de modo geral.

Neuromodulação

Diferenciar o conceito de neuromodulação da neurotransmissão é uma tarefa difícil, uma vez que ambos podem ser definidos de diversas formas e muitas vezes um mesmo fenômeno pode ser interpretado de ambos os modos, as quais divergem por uma questão espacial e temporal. Contudo, nesse capítulo iremos abordar algumas interpretações desse conceito e seu *modus operandi* com o propósito de entendermos melhor esse importante fenômeno fisiológico.

Em 1967, Ernest Florey (1967; apud Clarac e Pearlstein., 2007) baseando-se em seus estudos com uma substância que ele denominou similar à serotonina, introduziu o termo “substância moduladora”, a qual se refere a qualquer composto de origem celular ou não sináptico que fosse capaz de alterar a excitabilidade da célula nervosa regulando os mecanismos de controle do desempenho do sistema nervoso (Clarac e Pearlstein., 2007).

Posteriormente, o conceito da ação modulatória de alguns transmissores começou a emergir por meio de algumas evidências contundentes, *e.g.*, a ação de determinadas substâncias químicas, as quais não alterava a condutância ou o potencial de membrana, mas, ao invés, modificava algumas propriedades intrínsecas da célula (Hidaka *et al.*, 1967; Zieglgänsberger e Bayerl., 1976; apud Kupfermann., 1979).

Entretanto, somente no ano de 1979, que Kupfermann, após intenso debate com outros neurocientistas renomados (*e.g.*, Eric Kandel), definiu a

neuromodulação¹⁹ como um fenômeno que ocorre quando uma substância liberada de um neurônio promove uma resposta diferente da observada com os NTs (excitação ou inibição do potencial de membrana), que preferencialmente podem ser mudanças nas propriedades celulares ou sinápticas do outro neurônio.

Além disso, Paul Katz (1999) baseado no estudo do circuito neural CPG (do inglês, *Central Pattern Generators*) propôs a existência de duas formas de neuromodulação: a extrínseca e a intrínseca. Nesse modelo, a neuromodulação extrínseca corresponde à ação modulatória de uma determinada substância sobre os neurônios do CPG, liberada por outro neurônio localizado fora desse circuito, enquanto, a intrínseca é a modulação direta entre os próprios neurônios desse circuito.

Atualmente, não podemos mais usar esses modelos como regra do conceito, uma vez que novos paradigmas relacionados a esse fenômeno surgiram, assim como a nossa compreensão das estruturas e funções envolvidas na transmissão sináptica avançaram. Sobretudo, o conceito de neuromodulação se tornou mais abrangente, o que nos remete ao seu principal papel na transmissão sináptica, que é fornecer os meios necessários para o ajuste da transmissão da informação entre os diversos tipos celulares do sistema nervoso, tornando esse tipo de comunicação celular mais eficaz.

De fato, os astrócitos também liberam diversas substâncias que agem como moduladores e transmissores, tais como o fator neurotrófico derivado das células gliais (GDNF, do inglês *glia cell-derived neurotrophic factor*), ATP, D-serina,

¹⁹ Embora, inicialmente, o termo neuromodulação tenha sido utilizado para descrever intervenções terapêuticas para a atenuação da dor através de estímulos elétricos (ver em Gildenberg, 2005).

glutamato, as quais influenciam diretamente a transmissão sináptica neuronal (Gomes *et al.*, 2009; Perea *et al.*, 2009). Além disso, já se sabe que os neurônios liberam diversas moléculas moduladoras, entre elas os próprios neurotransmissores, que são capazes de regular o funcionamento dos astrócitos (Theodosis *et al.*, 2008).

Interessantemente, na transmissão sináptica, os próprios neurotransmissores liberados pelos neurônios pré-sinápticos, que inicialmente agem nos neurônios pós-sinápticos como transmissores, em seguida podem também agir como moduladores da sua própria liberação nos neurônios pré-sinápticos, ou seja, o tipo de receptor a qual essa molécula se liga e a sua localização na sinapse influênciam seu papel nesse tipo de comunicação sináptica. Deste modo, regular a exata quantidade do neurotransmissor liberado é um mecanismo modulatório importante da transmissão da informação entre os neurônios pré- e pós-sinápticos.

Um bom exemplo são os autorreceptores pré-sinápticos colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, que aumentam e diminuem a liberação da acetilcolina nos terminais colinérgicos em resposta a demanda, respectivamente (Marchi e Grilli, 2010). No entanto, em algumas sinapses, também são encontrados outros tipos de receptores pré-sinápticos, denominado heterorreceptores²⁰, os quais modulam a exocitose das VS mediados por moléculas diferentes do neurotransmissor liberado. Estas moléculas são denominadas neuromoduladores,

²⁰ Nesse caso, o termo heterorreceptor significa: receptor encontrado em uma determinada sinapse a qual recebe a informação de uma molécula diferente do neurotransmissor utilizado na sinapse propriamente dita.

e.g., a adenosina, endocanabinóide e BDNF (Barraco *et al.*, 1995; Chevalleyre *et al.*, 2006; Magby *et al.*, 2006).

Embora os receptores ionotrópicos sejam capazes de aumentar a liberação de neurotransmissores, em especial, via o influxo de cálcio (Sperlágh *et al.*, 2007; Marchi e Grilli., 2010), são os receptores metabotrópicos que possuem o papel de protagonista na modulação da exocitose da VS. Esses receptores são acoplados a proteína G que é composta de três subunidades (α , β e γ), as quais regulam diversos efetores intracelulares incluindo fosfolipase C, adenilil ciclase, calmodulina e componentes da cascata da proteína cinase ativadora mitogênica (Betke *et al.*, 2012).

A ativação da proteína G_α pré-sináptica do tipo i/o inibe a liberação de NT (Stephens., 2009), enquanto a do tipo s e q facilitam a exocitose da VS via modulação de segundo mensageiros intracelulares e proteínas envolvidas na liberação de neurotransmissores (Brown e Sihra., 2008). Além disso, a subunidade $\beta\gamma$ da proteína G também pode regular a transmissão sináptica inibindo os canais de cálcio dependente de voltagem (Miller., 1998).

Ao nível pós-sináptico, a resposta celular ao sinal pode ser regulada por meio de diversos mecanismos modulatórios. A dessensibilização e a internalização dos receptores pós-sináptico diminuem a resposta dessa célula ao sinal (Mierlak e Farb., 1988; Hannan *et al.*, 2011). Por outro lado, a inserção e estabilização dos receptores na membrana plasmática do neurônio pós-sináptico potencializa a resposta ao estímulo, *e.g.*, a proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD-95, do inglês *postsynaptic density-95*) estabiliza os receptores glutamatérgicos do tipo

NMDA na superfície da membrana e recruta o do tipo AMPA para região sináptica (Bats *et al.*, 2007; Prybylowski *et al.*, 2005). Sendo assim, tais efeitos regulatórios destacam a importância da neuromodulação pós-sináptica na transdução do sinal da transmissão sináptica.

Além disso, é sabido que algumas sinapses também regulam sua própria atividade por meio de sinalização retrógrada (Zilberter *et al.*, 2005). Nesse caso, os dendritos dos neurônios pós-sinápticos sintetizam e liberam mensageiros químicos que agem nos botões pré-sinápticos, os quais modulam o “tamanho da sinapse”, *e.g.*, nos neurônios do hipocampo, o modulador endocanabinóide é sintetizado a partir dos lipídios da membrana do dendrito em resposta à ativação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos que diminui a liberação de neurotransmissores dos neurônios pré-sinápticos via ativação dos receptores do tipo CB₁ pré-sinápticos (Chevalleyre *et al.*, 2006).

Os mecanismos modulatórios pré- e pós-sinápticos participam diretamente do fenômeno fisiológico, denominado de plasticidade sináptica, *i.e.*, as modificações na transmissão sináptica de curta ou longa duração em resposta a demanda. A plasticidade sináptica é um importante mecanismo modulatório da transmissão sináptica, que por sua vez está envolvido no controle de processos neurofisiológicos, tais como o aprendizado e a formação da memória através da potencialização e depressão de longa duração das sinapses (também conhecidos como LTP e LTD, do inglês *long-term potentization / depression*, respectivamente) (Mayford *et al.*, 2012).

A cotransmissão, a heteromerização dos receptores, a transmissão extrassináptica e a gliotransmissão adicionaram mais variáveis a esse fenômeno, tornando-o mais complexo e dinâmico do que somente os exemplos abordados nesse capítulo (Hnasko e Edwards., 2012; Ferré *et al.*, 2007; Fuxe *et al.*, 2010; Perea *et al.*, 2009). Além disso, a dificuldade em integrar essa grande quantidade de mecanismos neuromodulatórios e suas múltiplas funções no contexto fisiológico, torna a compreensão desse conceito outro importante desafio da neurociência desse século.

Sobretudo, um novo conceito modulatório vem emergindo nos últimos anos, a metamodulação, isto é, em outras palavras, o “ajuste fino” da neuromodulação (Ribeiro e Sebastião., 2010). Nesse contexto, nos últimos 15 anos, uma molécula neuromoduladora vem despertando a atenção da comunidade científica, devido sua característica neuromodulatória ubíqua *per se*, assim como sua capacidade em regular a neuromodulação de forma precisa, molécula esta, foco do próximo capítulo.

Adenosina: modulação e metamodulação da transmissão sináptica

Em 1929, Drury e Szent-Györgyi descreveram a influência da adenosina na modulação do sistema cardiovascular. Desde então, o papel modulatório dessa molécula e seus receptores vêm sendo extensivamente estudados com o propósito de se entender os mecanismos envolvidos nesse tipo de sinalização, bem como para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas (Burnstock., 2007).

A adenosina é um nucleosídeo proveniente do catabolismo do trifosfato de adenosina (ATP), que age como modulador endógeno, isto é, altera o funcionamento celular, possibilitando a regulação da atividade fisiológica em diversos órgãos, tecidos e células.

A ação da adenosina é mediada pelos receptores purinérgicos do tipo P₁, os quais são divididos em quatro diferentes subtipos A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃, nomenclatura adotada pela NC-IUPHAR (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drugs Classification*). Os quatro subtipos de receptores de adenosina são receptores metabotrópicos, isto é, possuem sete domínios transmembrânicos e são acoplados à proteína G. Sendo os receptores A₁ e A₃ acoplados à proteína G do tipo G_{i/o}, enquanto os receptores A_{2a} e A_{2b} são acoplados à proteína G do tipo G_s. Além disso, eles podem existir na forma de monômeros, homodímeros, heterodímeros e oligômeros, *e.g.*, A₁-A₁, A_{2a}-CB₁ e A_{2a}-D₂-mGlu₅ (Fredholm., 2011).

Os receptores A₁ são expressos no coração, estômago, glândula adrenal, tecido adiposo branco e no sistema nervoso central. Diversos efeitos modulatórios

estão associados com sua ativação como, por exemplo, redução da frequência cardíaca, inibição da lipólise e estimulação da absorção da glicose pelos adipócitos brancos, assim como a modulação da transmissão sináptica (Palmer e Stiles., 1995)

Os receptores A_{2a} (rA_{2a}) são amplamente distribuídos nas mais variadas espécies e encontrado na maioria dos tecidos em mamíferos. A ativação do rA_{2a} está relacionada com diversas respostas fisiológicas dependendo da localização e do tecido. A adenosina agindo sobre o rA_{2a} nas artérias coronárias induz vasodilatação (Shryock *et al.*, 1998), em tecidos periféricos promove proteção celular (Linden., 2005) e na pele reduz a formação de úlceras e inflamação (Peirce *et al.*, 2001).

No sistema nervoso central; o agonista do rA_{2a} promove neuroproteção em algumas condições experimentais, como na hemorragia cerebral (Mayne *et al.*, 2001) e isquêmica na medula espinal (Cassada *et al.*, 2002). Já os receptores A_{2b} são encontrados em grande quantidade no intestino delgado e em baixos níveis no cérebro, assim como evidências sugerem seu envolvimento com processos alérgicos e inflamatórios (Fredholm *et al.*, 2001).

Os receptores A_3 são expressos em grande número somente no pulmão e fígado. Estudos indicam que esse receptor está envolvido no controle do ciclo celular e inibição do crescimento tumoral em modelos *in vitro* e *in vivo* (Yaar *et al.*, 2005). De fato, células tumorais expressam mais receptores A_3 que células saudáveis (Gessi *et al.*, 2004), sugerindo um potencial alvo terapêutico para essa doença.

Adicionalmente, o desenvolvimento de agonistas e antagonistas seletivos de alta potência para esses receptores foi um importante passo na criação de novas abordagens terapêuticas no tratamento de diversas doenças (Muller., 2001). Os descritos para os receptores A_1 estão em testes clínicos para arritmias cardíacas e para a dor neuropática. Os agonistas dos receptores A_{2B} estão sob investigação pré-clínica para o tratamento de isquemia cardíaca e os dos receptores A_3 para o tratamento da artrite reumatoide e do câncer de colón e reto (Gao e Jacobson., 2007).

Atualmente, os antagonistas dos receptores A_{2a} são a terapia Parkinsoniana não dopaminérgica mais promissora, que já está na fase III dos experimentos clínicos (Lewitt *et al.*, 2008). Essa abordagem terapêutica ocorre devido a identificação da coexpressão e interação dos receptores A_{2a} e D_2 , formando heterodímeros ($rA_{2a}-D_2$) nos neurônios dopaminérgicos do núcleo nigroestriatal. Essa característica ajuda a entender os mecanismos envolvidos no efeito ativador motor e neuroprotetor da cafeína, um antagonista do rA_{2a} , que vem sendo bastante explorado na literatura com um enfoque terapêutico preventivo na doença de Parkinson (Chen *et al.*, 2001; Goetz *et al.*, 2005). A manipulação dos rA_{2a} também tem mostrado efeitos benéficos em modelos animais da doença de Huntington (Popoli *et al.*, 2007), destacando assim, seu potencial terapêutico nas doenças neurodegenerativas.

A onipresença da adenosina no sistema nervoso e suas múltiplas ações regulatórias sugerem que essa molécula possui um importante papel neuromodulatório, em especial na neurotransmissão. Inicialmente, a descoberta que a adenosina possuía uma ação inibitória da transmissão sináptica da junção

neuromuscular foi a primeira evidência da neuromodulação da transmissão sináptica mediada por esse nucleosídeo (Ginsborg e Hirst., 1971 e 1972)²¹. Duas décadas depois, Correia-de-Sá e coautores (1991) demonstraram que diferentes tipos de receptores adenosinérgicos podiam ser expressos no mesmo terminal sináptico (receptores A₁ e A_{2a}), os quais possuíam efeitos inibitórios e excitatórios sobre a liberação dos neurotransmissores.

No ano seguinte, surgiu a primeira evidência do efeito modulatório excitatórios da adenosina sobre transmissão sináptica no sistema nervoso central (Sebastião e Ribeiro., 1992). Nesse trabalho, os autores demonstraram que o agonista do receptor A_{2a} induzia um aumento da excitação pós-sináptica em populações de neurônios do hipocampo. Deste modo, o receptor A_{2a} se tornou um importante foco do estudo da modulação da liberação de neurotransmissores no sistema nervoso central.

De fato, a ativação do rA_{2a} pré-sináptico em diferentes regiões do sistema nervoso central facilita a liberação de diversos neurotransmissores, *e.g.*, acetilcolina (Cunha *et al.*, 1995; Rebola *et al.*, 2000) e GABA (Cunha e Ribeiro., 2000b) no hipocampo, glutamato no núcleo estriado (Popoli *et al.*, 1995), GABA no globo pálido (Ochi *et al.*, 2000), tal qual glutamato, noradrenalina e vasopressina no núcleo do trato solitário (Castillo-Melendez *et al.*, 1994; Barraco *et al.*, 1995; Scislo e O'Leary., 2006).

²¹ Embora não tenha sido afirmado diretamente pelos autores, esses dados já sugeriam a relação da adenosina com a via de sinalização intracelular mediada pelo AMP cíclico e a modulação da liberação de neurotransmissores.

O mais bem conhecido mecanismo de transdução de sinal do rA_{2a} é via da regulação da enzima adenilil ciclase (AC) por meio da ligação da subunidade α da proteína G_s . A adenilil ciclase é um mecanismo importante na geração de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que por sua vez aumenta a liberação de neurotransmissores pela modulação do aparato de exocitose das VSs (Zhong e Wu., 1991; Chavez-Noriega e Stevens., 1994; Chen e Regehr., 1997). Uma via ativada pelo AMPC é a da proteína cinase ativada pelo AMPC (PKA, do inglês *protein kinase A*), que já demonstrou ser um mecanismo importante na facilitação da liberação de neurotransmissores em neurônios hipocâmpais (Capogna *et al.*, 1995; Trudeau *et al.*, 1996; Trudeau *et al.*, 1998).

Interessantemente, diversos estudos demonstraram que o AMPC pode facilitar a liberação de neurotransmissores mediada por outras vias, chamadas de não dependente de PKA, *e.g.*, via proteína de troca ativada diretamente pelo AMPC (EPAC, do inglês *exchange protein activated by cAMP*), também conhecida como proteína de troca do nucleotídeo guanina regulada por AMPC (cAMPGEF, do inglês *cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors*) (Kashima *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2003; Kaneko e Takahashi., 2004). Desta forma, a proteína EPAC se tornou um importante mecanismo modulatório da liberação de neurotransmissores mediado pela via de sinalização do AMPC.

É importante, também, destacar que os receptores A_{2a} também podem modular a liberação de neurotransmissores pela ativação de diferentes vias de sinalização intracelular, denominado mecanismos de “*cross talk*”. Na artéria caudal de ratos a ativação do rA_{2a} facilita a liberação de noradrenalina em terminais nervosos mediada pela via de sinalização da adenilil ciclase e fosfolipase C (Fresco

et al., 2004). Em neurônios do hipocampo, o rA_{2a} via ativação da proteína cinase C facilita a transmissão sináptica (Cunha e Ribeiro, 2000a).

A forma como a adenosina ajusta diretamente a liberação de neurotransmissores é considerada seu efeito neuromodulatório sobre a transmissão sináptica. Entretanto, suas ações modulatória sobre outros mecanismos neuromodulatórios destacam sua importância no “ajuste fino” nesse tipo de comunicação celular.

De fato, a adenosina exerce um fino ajuste do efeito facilitatório da transmissão sináptica mediada pelo peptídeo relacionado com o gene da calcitonina na área CA1 do hipocampo (Sebastião *et al.*, 2000). Além disso, a ativação dos receptores A_{2a} é capaz de transativar os receptores de alta afinidade de tirosina cinase (TrkB, do inglês *tropomyosin-related kinase receptor B*) na ausência de BDNF (Diógenes *et al.*, 2004), assim como a inibição dos rA_{2a} em cultura de células da medula espinal de ratos reduz os níveis do TrkB fosforilado (Mojsilovic-Petrovic *et al.*, 2006). Na microglia, o agonista do rA_{2a} aumenta a expressão e liberação do fator de crescimento do nervo (NGF, do inglês *nerve growth factor*) (Heese *et al.*, 1997). Desta forma, essas evidências sugerem que a adenosina é um regulador desses mecanismos neuromodulatórios, ou seja, um metamodulador.

Em adição, o receptor A_{2a} influencia diretamente o nível extracelular da própria adenosina através da modulação dos ENTs (do inglês, *equilibrative nucleoside transporter*), assim como o transporte do GABA por meio do GAT1 (Pinto-Duarte *et al.*, 2005; Cristovão-Ferreira, 2009). O aumento de velocidade do

transporte do GABA para o interior nas terminações neuronais pode contribuir com a reciclagem do neurotransmissor e, portanto, também influencia a transmissão sináptica.

Por fim, algumas importantes características da adenosina devem ser consideradas como, por exemplo, seu papel na comunicação entre as células neurais (neurônios e glias), a modulação na liberação e ação de diversos neurotransmissores e neuromoduladores e, especialmente, sua onipresença no sistema nervoso central. Logo, baseado nas evidências abordadas nesse capítulo é postulado, ao menos para a modulação da transmissão sináptica, que a adenosina possui um papel de “maestro”, a qual coordena e controla a atividade neural e, portanto, compreender o seu *modus operandi* tornou-se um requisito fundamental para entendermos a neurotransmissão *per se* e suas disfunções.

Núcleo do trato solitário

No século dezenove, Dittmar observou que lesões em algumas regiões no bulbo provocavam mudanças significativas na pressão arterial. No entanto, somente na década de 70 do século seguinte, que teve o início a caracterização dessas regiões e a descrição de suas funções modulatórias sobre o sistema cardiorespiratório (Guertzenstein., 1972; Miura e Reis., 1972; Sved *et al.*, 2002).

Uma dessas regiões identificadas foi o núcleo do trato solitário (NTS) localizado na região dorsomedial do bulbo. O NTS é um importante centro integrador das informações viscerosensoriais e responsável por coordenar diversos reflexos autonômicos, *e.g.*, cardiovascular, respiratório e gastrointestinal (Dampney., 1994).

Os sistemas cardiovascular, respiratório e gastrointestinal não são estáticos, mas se adaptam a cada momento sob diversas circunstâncias. Portanto, o mesmo pode ser dito para os circuitos neurais no NTS que regulam esses sistemas. As sinapses nesses circuitos possuem um grau elevado de especificidade e plasticidade, em parte, para integrar uma variedade de estímulos viscerosensoriais que necessitam de uma regulação precisa (Zhou *et al.*, 1997; Bonham *et al.*, 2006). No NTS são encontrados mais de 30 diferentes tipos de neurotransmissores e neuromoduladores, entre eles glutamato, noradrenalina e adenosina (van Giersbergen *et al.*, 1992; Palkovits., 1985).

As primeiras evidências que o glutamato (GLU) está envolvido com o processamento das informações viscerosensoriais no NTS foram observadas por Talman e coautores (1980). Eles fizeram microinjeções de GLU na região intermediária do NTS a qual induziu hipotensão, bradicardia e apneia. A

compreensão do papel do glutamato no NTS rapidamente se expandiu durante as décadas de 80 e 90, destacando-o como o principal neurotransmissor excitatório nesse núcleo (Talman *et al.*, 1984; Sved e Gordon., 1994).

No NTS, o glutamato age nos receptores ionotrópicos pós-sinápticos nos neurônios de segunda ordem (*i.e.*, o grupo de células neurais que recebem a informação das fibras aferentes viscerossensoriais) (Gordon e Sved., 2002), assim como também se liga nos receptores metabotrópicos pré-sinápticos, diminuindo sua própria liberação via inibição dos canais de cálcio do tipo N (Chen *et al.*, 2002) e pós-sinápticos, cuja ação é aumentar a amplitude dos potenciais pós-sinápticos excitatórios (Sekizawa e Bonham., 2006). Além disso, uma grande quantidade de transportadores vesiculares para o glutamato é encontrada no NTS, sendo os do tipo VGLUT2 presente por todo o núcleo, enquanto VGLUT1 estão mais distribuídos na parte lateral (Lin *et al.*, 2004).

No NTS, a noradrenalina (NOR) é sintetizada nos neurônios catecolaminérgicos A2, os quais são ativados por estímulos fisiológicos e estressores (Pacak *et al.*, 1995; Dayas *et al.*, 2001). O silenciamento desses neurônios induz um aumento na pressão arterial média (Duale *et al.*, 2007). Interessantemente, a densidade dos receptores α_2 -adrenérgicos no NTS está diminuída em linhagem de ratos hipertensos em comparação com normotensos durante o desenvolvimento (Carrettiero *et al.*, 2012). Sendo assim, esses dados sugerem que o sistema noradrenérgico no NTS exerce uma influência inibitória tônica da pressão arterial.

A adenosina é um potente modulador do sistema cardiovascular (Barraco *et al.*, 1988). No NTS, existem duas fontes de adenosina, ambas, via degradação

intra/extracelular do ATP. Sob condição fisiológica, o ATP é liberado sinapticamente e catabolizado através da enzima ectonucleotidase, enquanto o ATP intracelular é convertido em adenosina e posteriormente transportado através dos transportadores ENT durante condições patológicas, tais como hipóxia e hemorragia (Phillis *et al.*, 1987; St. Lambert *et al.*, 1997).

Uma grande quantidade dos receptores do tipo A₁ e A_{2a} são expressos nesse núcleo, assim como uma alta densidade de sítios de recaptção de adenosina (St Lambert *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2000; Bisslerbe *et al.*, 1985). Os receptores A₁ e A_{2a} modulam o sistema cardiovascular de maneiras opostas, *e.g.*, a ativação do rA₁ atenua os efeitos hipotensivos observados no baroreflexo, enquanto os rA_{2a} potencializa esse efeito (Barraco e Phillis 1991).

Em adição, ao nível pré-sináptico, a ativação do rA₁ e rA_{2a} inibe e aumenta a liberação de neurotransmissores respectivamente. De fato, a ativação dos receptores A_{2a} no NTS induz um aumento na liberação de diversos neurotransmissores no NTS, entre eles o glutamato e noradrenalina (Castillo-Melendez *et al.*, 1994; Barraco *et al.*, 1995), sugerindo um importante papel modulador na transmissão sináptica nesse núcleo.

Considerações

O estudo da neuroquímica e da comunicação celular é a base para a compreensão do funcionamento do sistema nervoso. A descoberta da diversidade de neurotransmissores, da liberação de dois ou mais mediadores químicos por um mesmo neurônio e a grande variedade de subtipos de receptores, trouxe enorme contribuição para a elucidação do processamento neural e as possibilidades de manipulação deste em caso de doenças. Recentemente, descobriu-se que a neuromodulação, ou seja, a capacidade que um sistema de neurotransmissão tem de modular outro sistema ou de ser modulado é muito importante para a complexidade do funcionamento do sistema nervoso além de ser considerado alvo para o desenvolvimento de medicamentos.

Nosso laboratório estuda, há algum tempo, o sistema adenosinérgico desvendando processos importantes envolvendo este sistema na regulação cardiovascular. Estes estudos mostram que os receptores de adenosina, além de estarem distribuídos de forma heterogênea dentro do NTS estão aumentados em ratos hipertensos quando comparados a ratos normotensos e que esta diferença parece preceder o desenvolvimento da hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos (Carrettiero e Fior-Chadi., 2004; Carrettiero e Fior-Chadi., 2009). Foi demonstrado, também, que os receptores de adenosina são capazes de modular os receptores α_2 -adrenérgicos em células do NTS. Esta ação modulatória é diferenciada em ratos normotensos quando comparados a ratos hipertensos (Carrettiero *et al.*, 2008). Além disso, no NTS, a adenosina modula transmissão sináptica de diversas maneiras, entre elas, facilitando a liberação de neurotransmissores (Castillo-Melendez *et al.*, 1994; Barraco *et al.*, 1995; Scislo e

O’Leary., 2006). No entanto, perguntas como qual via de sinalização intracelular é ativada nesse processo modulatório e como ela regula a liberação de neurotransmissores ainda permanecem sem resposta. Estes resultados sugerem que a adenosina pode ter um papel modulatório importante na transmissão sináptica, influenciando sobremaneira as ações mediadas pelas diferentes áreas do sistema nervoso.

Nessas últimas décadas, muitos paradigmas da neurotransmissão estão sendo quebrados com o avanço de novas técnicas que permitiram analisar de maneira mais profunda os fenômenos envolvidos nesse tipo de sinalização. A “optogenética”, termo que será inserido na próxima revisão do dicionário Oxford em 2019 e foi considerada o método do ano de 2010 pela revista Nature (Diesseroth., 2011), é um segmento da biotecnologia que combina engenharia genética com ótica para observar e controlar a função celular por meio de modificação genética de proteínas constitutivas com outras que são capazes de ser excitadas por luz, como por exemplo, a proteína fluorescente verde (GFP, do inglês *green fluorescent protein*) (Miesenböck., 2009). Destaca-se que o desenvolvimento de novos sensores celulares optogenéticos é proporcional ao número de trabalhos publicados que acrescentaram informações importantes à literatura sobre o estudo dos mecanismos envolvidos na liberação de neurotransmissores (Siegel *et al.*, 1997; Boyden *et al.*, 2005; Szobota *et al.*, 2007; Miyawaki *et al.*, 1997; Moulder *et al.*, 2007; Tabares *et al.*, 2007; Balaji *et al.*, 2008).

Nesse contexto, um sensor ótico biosintético de liberação de vesícula sináptica denominado supereclipse sinapto-pHluorina (SpH) vem sendo bastante utilizado nos estudos da neurotransmissão. O SpH é a fusão da proteína GFP

mutante sensível ao pH com e a proteína VAMP2 inseridos no DNA de plasmídeo que pode ser transfectado em cultura de células (Miesenböck *et al.*, 1998). Utilizando-se da técnica de transfecção e excitação da SpH através de LASER no aparato de microscopia confocal, permite a visualização da liberação de vesículas sinápticas em resposta a um determinado estímulo, seja ele de origem elétrica ou farmacológica.

Além disso, apesar de se ter conhecimento sobre as diversas ações da adenosina em várias áreas do sistema nervoso e, em particular, no bulbo, os mecanismos envolvidos nestas ações e como eles interferem na dinâmica da neurotransmissão, ainda é pouco conhecido. A possibilidade de se poder estudar, na célula viva, como a adenosina modula a liberação de neurotransmissores nos neurônios é extremamente importante não só para elucidar as ações e mecanismos dessa purina, mas de processos da neurotransmissão de um modo geral.

Desta forma, sabendo-se que.

- A neurotransmissão é um mecanismo de sinalização celular especializado e modulável em todas as etapas de seu funcionamento. A modulação na liberação de neurotransmissores é um processo complexo que vem sendo extensivamente estudado.
- A adenosina é um neuromodulador conhecido como tendo importante ação modulatória em diversos sistemas de neurotransmissão inclusive com vistas à utilização terapêutica e farmacológica.
- Os receptores pré-sinápticos A_{2a} de adenosina modulam a liberação de neurotransmissores em diversas regiões do SNC.

- A via de transdução de sinal utilizada pelo rA_{2a} é por meio do AMPc, um segundo mensageiro intracelular, que ativa diversos mecanismos regulatórios, entre eles, a PKA e o EPAC.
- A PKA e o EPAC são capazes de interagir de maneira distinta com o aparato envolvido na liberação das vesículas sinápticas.
- As moléculas envolvidas na liberação de neurotransmissores são passíveis de regulação por meio de fosforilação por proteínas cinases.
- A técnica de transfecção de células neuronais com o plasmídeo que expressa supereclipse sinapto-pHluorina, permite a visualização em tempo real da liberação das vesículas sináptica.

Então, foi proposto analisar o efeito modulatório da adenosina agindo sobre o receptor A_{2a} de adenosina na liberação de neurotransmissores. Este estudo teve como objetivo, além da análise do efeito modulatório previamente dito, avaliar as possíveis vias de sinalização intracelular envolvidas nessa modulação e seus mecanismos de ação.

OBJETIVO GERAL

Analisar a modulação na liberação de neurotransmissores evocada pela ativação do receptor A_{2a} de adenosina e sua via de sinalização intracelular em células provenientes do bulbo de ratos Wistar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Analisar o efeito modulatório do agonista seletivo do receptor A_{2a} de adenosina na liberação de vesículas sinápticas em cultura de neurônios transfectados com supereclipse sinapto-pHluorina utilizando-se de microscopia confocal.

2 – Analisar as vias de sinalização intracelular responsável pela modulação na liberação de vesículas sinápticas promovida pela ativação do receptor A_{2a} de adenosina utilizando-se de bloqueadores e ativadores específicos das vias intracelulares envolvida nesse fenômeno.

3 – Analisar a quantidade dos neurotransmissores liberados em resposta ao tratamento com o agonista seletivo do receptor A_{2a} de adenosina e os inibidores das vias intracelulares utilizando-se da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

4 – Analisar a ativação de proteínas envolvidas na liberação das vesículas sinápticas em resposta ao tratamento com o agonista seletivo do receptor A_{2a} de adenosina e os inibidores das vias intracelulares por meio de marcação com anticorpos específicos para a proteína fosforilada utilizando-se da técnica de In-Cell Western.

MÉTODO

3.1-Animais

Todos os procedimentos foram devidamente aprovados (Protocolo 114/2010; ver em apêndice) pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEUA-IB-USP).

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*) neonatos da linhagem Wistar, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

3.2-Cultura de Células

Para a cultura de células, a metodologia empregada foi uma modificação da descrita por Kivell e coautores (2001). Os encéfalos foram removidos e a porção do bulbo dorsomedial contendo o núcleo do trato solitário de ratos neonatos foi separada e colocada em placa de petri estéril com solução tampão gelada constituída de NaCl (120mmol/l), KCl (5mmol/l), KH_2PO_4 (1,2mmol/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,2mmol/l), NaHCO_3 (25mmol/l) e glicose (13mmol/l). O pH do tampão foi ajustado para 7,2 e em seguida filtrado em membrana de 0,2 μm de poro (Millipore, E.U.A.) dentro de fluxo laminar (Veco, Brasi) para esterilização.

Ao término da retirada dos encéfalos de todos os ratos, as células do bulbo foram dissociadas através de incubação à 37°C com tripsina e homogeneizadas suavemente em tubo de polipropileno (Falcon, E.U.A.) por 15 vezes. Após

aproximadamente 5 minutos de espera para que os pedaços de tecido não dissociados decantem, o sobrenadante contendo as células dissociadas em suspensão foi separado para um novo tubo. Este procedimento foi repetido por aproximadamente 3 vezes para a extração da grande maioria das células do tecido. Os tubos contendo as células em suspensão foram centrifugados a 300 x g durante 5 minutos para que as células precipitem.

A solução aquosa foi descartada vertendo-se o tubo e as células ressuspensas em meio de cultura Neurobasal A (Gibco, E.U.A.) suplementado com l-glutamina (250µmol/l; Sigma, E.U.A.), glutamax (250µmol/l; Gibco, E.U.A.), complexo B27 (2%; Gibco, E.U.A.) e gentamicina (40mg/l; Gibco, E.U.A.). As células viáveis foram identificadas através de exclusão das coradas com trypan blue (0,4%; Gibco, E.U.A.) na proporção de 19:1 (190µl de solução das células e 10µl do corante) e contadas em Câmara de Neubauer a fim de se plaquear 1800 células por milímetro quadrado.

Para a melhor adesão celular, as placas de cultura foram tratadas com poli-D-lisina (10mg/L, Sigma, E.U.A.) durante 40 minutos no dia anterior à cultura, sendo lavada 3 vezes com água destilada estéril seguida de incubação por 2 horas com soro fetal bovino (10%; Gibco, E.U.A.) momentos antes do plaqueamento das células.

Após o plaqueamento, o meio de cultura foi trocado a cada 72 horas e mantido na incubadora à 37°C com uma PCO₂ em 5%, para melhor desenvolvimento da célula.

3.3-Fármacos e soluções

Glutamato, noradrenalina, brefeldina A, CGS21680, H89, GDH, NAD⁺ (Sigma, E.U.A.); 6Bnz e 8-pCPT (BioLog, Alemanha) e ZM241385 (TOCRIS, E.U.A.).

Solução de trabalho (ST) é composta (mM) de 140 NaCl, 5 KCl, 5 ClCa²⁺, 1 MgCl₂, 10 HEPES/NaOH e 20 Glicose e o pH ajustado para 7,3.

3.4.1-Amplificação e recuperação Supereclipse sinapto-pHluorina

O plasmídeo contendo o marcador de vesícula sináptica supereclipse sinapto-pHluorina foi gentilmente cedido pelo Professor Gero Miesenböck do Departamento de Fisiologia, Genética e Anatomia da Universidade de Oxford.

Os processos de amplificação e recuperação do plasmídeo contendo o SpH (pSpH) já foram realizados com êxito seguindo os protocolos descritos abaixo.

A membrana contendo o pSpH foi incubada a temperatura de 52,5°C por 3 horas em 500µl de tampão TE constituído de trisma-HCl 1M e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 100mM. Após o período de incubação, a quantidade de DNA (0,9ng/µl) contida no tampão TE foi aferida no equipamento NanoDrop (Thermo Scientific, E.U.A.).

A transfecção do pSpH foi realizada por meio de choque térmico. Resumidamente, 10µl do tampão TE contendo o pSpH foi adicionado em um tubo contendo 190µl do tampão para estocagem de bactéria em -80°C composta por

C₂H₃KO₂ 10mM, glicerol re-destilado 10% (m/v), KCl 100mM, MnCl₂4H₂O 45mM, CaCl₂2H₂O 10mM, HAcCoCl₃ 3mM, pH 6,2 e a bactéria DH5 α . O choque térmico foi composto de três etapas: à 0°C por 20 min, em seguida à 42°C por 1,5 min e novamente à 0°C por 2 min. Como controle da transfecção foi utilizado o plasmídeo pUC18 (Dower, 1988).

Após a transfecção foi adicionado 800 μ l de meio SOB composto por triptoma 2%, extrato de levedura 0,5% NaCl 10mM e KCl 2,5mM, MgCl₂ 20mM, MgSO₄ 20mM e incubado à 37°C por 1 hora. O volume foi plaqueado em placa para cultura de bactéria contendo ampicilina, isopropil- β -D tiogalactosida (IPTG) e 5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosida (Xgal); e incubado a 37°C por 18 horas.

Cinco colônias de bactérias transfectadas com o pSpH foram retiradas da placa e inseridas separadamente em tubos de vidro contendo 3 ml de meio SOB cada e incubados novamente à 37°C por 18 horas.

Após esse período, 1,5ml do meio SOB de cada tubo contendo as bactérias transfectadas foram submetidos a purificação do DNA de plasmídeo seguindo o protocolo QIAprep Spin Midiprep Kit (QUIAGEN, E.U.A.).

Para confirmação dos procedimentos descritos acima. O DNA de plasmídeo purificado foi submetido à digestão enzimática utilizando enzimas de restrição (PSTI e Sall) para seus respectivos sítios na região do vetor pCI (Promega, E.U.A.) onde o SpH foi inserido.

3.4.2-Transfecção das culturas com o SpH

Sete dias após plaquear, as células foram transfectadas com SpH utilizando-se lipofectamina LTX (Invitrogen, E.U.A.) seguindo o protocolo do fabricante. Um dia após a transfecção, o meio de cultura foi trocado pela solução de trabalho (ST) contendo 2u/ml da enzima adenosina deaminase (ROCHE, E.U.A.) e submetidas ao tratamento com o agonista e o antagonista seletivos para o rA_{2a} , assim como ativadores e inibidores da PKA e EPAC. As células foram mantidas à 37°C no microscópio confocal Zeiss LSM510 (Zeiss, Alemanha) e estimuladas usando o laser com emissão no comprimento de onda de 488 nm (Coherent, E.U.A.) e dispositivo de emissão de luz ultravioleta no comprimento de onda de 364 nm (Enterprise, Coherent, E.U.A.). O espelho dicróico utilizado foi o UV488 e a fluorescência coletada com o filtro passa baixa em 485 e 385 nm respectivamente. Utilizou-se uma objetiva plan-neofluor 40x com abertura numérica 1.3 para visualização das células. As imagens foram obtidas por meio do escaneamento no modo “*time series*”, a qual permitiu a adição dos fármacos e a observação dos seus efeitos em tempo real.

3.5-Dosagem do aminoácido glutamato e noradrenalina na solução de trabalho

3.5.1- Aparato de cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

As análises do conteúdo de glutamato e noradrenalina foram realizadas no laboratório coordenado pela Profa. Regina P. Markus do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Utilizou-se o sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (LC10A, Shimadzu, Japão) e uma coluna de fase reversa C18 de 5µm medindo 25cm X 4,6mm (Supelco, E.U.A.). A detecção do aminoácido glutamato foi obtida por meio de fluorescência, enquanto da noradrenalina foi através de detecção eletroquímica seguindo os protocolos utilizados em Fernandes (1994) (glutamato) e Ferreira e coautores (2004) (noradrenalina) com pequenas modificações.

3.5.2-Preparo da fase móvel utilizada na quantificação do glutamato e da noradrenalina

As soluções foram filtradas em filtros com poros de 0,22µm num sistema de filtração á vácuo (Millipore, E.U.A.).

Utilizou-se um sistema isocrático para ambas moléculas com uma fase móvel constituída por tampão citrato de sódio 0,05M, pH 5,95, metanol 85/15

(v/v), ao fluxo de 1ml/s à temperatura ambiente para detecção do aminoácido glutamato, enquanto para a detecção da monoamina noradrenalina utilizou-se uma fase móvel constituída de fostato dibasico de sódio 0,02M, ácido cítrico 0,02M, EDTA 0,02M, ácido heptasulfônico 556 mg l⁻¹, metanol 2%, pH 2,64, ao fluxo de 0,5ml/s, com o pontencial de detecção ajustado em -80mV.

3.5.3-Preparo das curvas padrão

As soluções estoque do aminoácido glutamato foram preparados em HCl 0,01M e armazenados à -20°C por até 1 mês, posteriormente diluídos em concentrações entre 3,9 e 0,1µM em ácido perclórico 0,1M.

Enquanto que a noradrenalina foi preparada em HCl contendo 2% metabisulfito de sódio (Na₂S₂O₅) e estocadas à -80°C por até 1 mês, posteriormente diluídos 1,8 e 0,6µM em ácido perclórico 0,1M.

3.5.4-Derivatização do aminoácido glutamato

A derivatização do glutamato é o procedimento a qual o aminoácido reage com o composto O-fitaldeído / β- mercaptoetanol (OPA/BME) em uma solução tampão com o pH entre 8,0 e 9,5 produzindo fluorescência.

A solução estoque de derivatização foi obtida dissolvendo-se 27mg de OPA em 1ml de metanol, acrescentando-se em seguida 5µl de BME e 9ml do tampão

tetraborato de sódio 0,1M, pH 9,3 e armazenado em tubo de plástico âmbar à temperatura ambiente por até 5 dias.

Pelo menos 1 hora antes da análise das amostras, uma solução foi preparada diluindo-se 1ml da solução estoque com 2ml da solução tampão tetraborato de sódio 0,1M, pH 9,3. A derivatização pré-coluna foi realizada misturando-se vigorosamente por 15 s 100µl dessa solução com 50µl da amostra ou do padrão de glutamato seguida por 2 min de incubação. Após incubação, 20µl da amostra derivatizada foi injetada no sistema para análise.

3.5.5-Curva temporal

No sétimo dia, o meio de cultura foi substituído pela solução de trabalho e mantido a 37°C, 5% pCO₂ por 30 min para a adaptação ao novo meio. Após esse período as células foram submetidas aos experimentos descritos a seguir. Primeiramente, para determinar o tempo de tratamento a ser utilizado foi realizado o experimento de curva temporal, cada cultura foi submetida a duas situações: A – somente com a solução de trabalho (controle) e B – a solução de trabalho com CGS21680 (10µM) por 1, 3, 5, 7 e 10 s. As diferenças estatísticas na análise do glutamato e noradrenalina foram calculadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via.

3.5.6- Curva concentração-resposta

Para determinar o EC_{50} do CGS a ser utilizada nos experimentos subsequentes de inibição das vias de sinalização intracelulares foi realizado uma curva concentração resposta, seguindo o mesmo padrão de situação do experimento temporal anterior (A=controle e B=tratado).

As células foram submetidas ao tratamento com CGS nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100 μ M por 5 s.

Os dados foram plotados em uma curva de regressão não linear e normalizados com seus respectivos controles.

3.6-Ensaio enzimático

Na presença de glutamato, a enzima L-glutâmico desidrogenase (GDH) reduz β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) em α -queroglutarato e NADH, este último produz fluorescência quando excitado com luz ultravioleta no comprimento de onda de 364nm (Bezzi *et al.*, 1998).

Imagens foram obtidas através do microscópio Zeiss LSM 510 Axiovert (Zeiss, Alemanha). A molécula NADH foi excitada por luz ultravioleta (364 nm) provida pela fonte de luz UV Enterprise (Coherent, E.U.A.). A fluorescência emitida foi coletada através do filtro passa baixa de 515 nm. Utilizou-se uma objetiva plan-neofluor 20x com abertura numérica 1.3 para visualização das células. As imagens foram obtidas por meio do escaneamento no modo “*time series*”, a qual permitiu a adição dos fármacos e a observação dos seus efeitos em tempo real.

No sétimo dia, o meio de cultura foi substituído pela solução de trabalho e mantido a 37°C, 5% pCO₂ por 30 min para a adaptação ao novo meio. Em seguida foi adicionado a solução de trabalho GDH (50 unidades / ml) e NAD⁺ (2mM) à ~23°C, após a estabilização da linha de base a cultura foi tratada com 5μM de CGS. Os dados são expressos como dF/Fo, onde Fo representa os níveis de fluorescência no campo ótico antes do tratamento (média dos dez primeiros pontos) e dF representa as mudança nessa fluorescência após o tratamento. Para confirmar que o sinal de fluorescência foi originado da atividade extracelular do GDH, foi realizado outro experimento idêntico na ausência de um dos seus componentes. Nenhuma mudança no sinal de fluorescência foi observada na ausência de GDH ou NAD⁺.

3.7-Análise da fosforilação da sinapsina I através da técnica

In-Cell Western (ICW)

Para analisar a fosforilação da sinapsina I, utilizou-se o ensaio In-Cell Western adaptado do protocolo de Chen e coautores (2005). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços como descrito anteriormente. Após os tratamentos, as culturas foram fixadas com 3,7% paraformaldeído por 20 min. Após a fixação, as células foram permeabilizadas com 5 lavagens de 0,1% Triton-X (Sigma, E.U.A.) em PBS 0,1M. Bloqueio foi realizado com 2% soro normal de cabra (NGS, do inglês *normal goat serum*; Vector, E.U.A.) 4% albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*; Sigma, E.U.A.) 0,2% Triton-X (Sigma, E.U.A.) em PBS por 30 minutos. Os anticorpos primários anti-sinapsina I (Synaptic

Systems, Alemanha), anti-sinapsina I fosforilada no resíduo serina 9 (sin I ser₉) (Abcam, Reino Unido) foram diluídos em 1:150 em solução de bloqueio e incubados a 4°C por 16 horas. Os anticorpos secundários anti-coelho IRDye 800CW (LI-COR Biosciences, Alemanha) diluídos em 1:500 em solução de bloqueio e anti-camundongo Alexa-Fluor 680 (Invitrogen, E.U.A.) diluídos em 1:200 em solução de bloqueio foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram escaneadas com o sistema de análise de imagens em infravermelho Odissey (LI-COR Biosciences, Alemanha) nos canais 700 e 800nm simultaneamente, localizado no laboratório coordenado pelo Prof. José Cipolla Neto no Instituto de Ciências Biomédicas - USP. Os resultados foram normalizados calculando-se a relação entre as intensidades das fluorescências das sinapsina I serina 9 e sinapsina I.

3.8-Análises dos dados

As imagens foram analisadas por meio do software para análise de Image J (NIH, E.U.A.). Os dados obtidos foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido do pós-teste Bonferroni ou Dunnett. Foram aceitas como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultar em um valor de *p* menor ou igual a 0,05. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 3.00 de 25 de março de 1999, para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, E.U.A.).

RESULTADO

4.1-Verificação do procedimento de recuperação do SpH

A região do vetor (pCI, Promega, E.U.A.) onde a sequência da SpH foi inserida possui sítios para as enzimas de restrição PSTI e Sall. Após a recuperação do pSpH, as amostras foram submetidas a digestão enzimática com as enzimas PSTI e Sall para avaliarmos a integridade do plasmídeo. Foi observado quatro fragmentos de DNA. Um fragmento do vetor pCI de aproximadamente 4Kb e outros três menores da sequência do SpH, sugerindo assim, a presença de outros sítios para as enzimas de restrição utilizadas na própria sequência do SpH (Figura 1).

Figura 1. Digestão de DNA de plasmídeo resultado da amplificação e recuperação do plasmídeo SpH. Números nas laterais indicam o tamanho em 1000 bases (Kb). C1 - 5 são pSpH purificados provenientes de cinco colônias distintas de bactérias transfectadas. Foram utilizadas as enzimas de restrição PSTI e Sall para digestão do DNA de plasmídeo com a sequência SpH. Como esperado, a primeira banda é o vetor pCI (4Kb) e as três bandas seguintes são os fragmentos de SpH (primeiro, segundo e terceiro fragmentos SpH). Isso ocorreu, devido a presença de mais sítios de restrição para as enzimas PSTI e Sall na sequência do SpH.

4.2-CGS induziu um aumento na fluorescência do SpH

O sensor biosintético fluorescente de liberação de vesículas sinápticas, SpH, vem sendo extensamente utilizado no estudo da neurotransmissão (Sankaranarayanan e Ryan., 2000; Atluri e Ryan., 2006; Moulder *et al.*, 2007). A ativação dos receptores A_{2a} de adenosina facilita a liberação de diversos neurotransmissores no sistema nervoso central incluindo no núcleo do trato solitário (Popoli *et al.*, 1995; Okaba *et al.*, 2001; Ochi *et al.*, 2000; Scislo e O'Leary., 2006). Para avaliarmos se esse fenômeno fisiológico também acontece em culturas de células do bulbo de ratos Wistar, nós transfectamos as células com SpH e analisamos as mudanças de fluorescência do SpH em resposta ao tratamento com o agonista e antagonista do rA_{2a} (CGS e ZM). Diversas células na cultura foram transfectadas com SpH, entretanto, somente uma célula por placa foi analisada.

Inicialmente, as cultura foram tratada com CGS, seguido dos tratamentos com ZM, CGS novamente e KCl. CGS induziu um aumento na fluorescência do SpH (Figura 2C e E). Para testarmos se essa resposta observada foi evocada pelo tratamento com CGS, a cultura foi tratada com o antagonista do rA_{2a} (ZM) e então, estimulada novamente com CGS e nenhuma mudança na fluorescência do SpH foi observada (Figura 2E). Para confirmarmos se o perfil de resposta observada no tratamento com ZM seguido do CGS foi devido ao antagonista do rA_{2a} ou se a célula não conseguia responder ao estímulo com CGS, nós tratamos a cultura com KCl, a qual despolarizou a membrana plasmática da célula e induziu um aumento na fluorescência do SpH indicando que essa célula ainda permanecia responsiva à estímulos (Figura 2D e E).

Figura 2. CGS induziu aumento na fluorescência em células do bulbo de ratos Wistar transfetadas com SpH. Após vinte quatro horas da transfecção com SpH, a cultura foi tratada com CGS (5 μ M), ZM (50 μ M) e KCl (90mM), barra de escala 10 μ m. Imagens foram obtidas através do microscópio Axioinvert LSM 510 na objetiva a óleo 40x sob excitação nos comprimentos de onda de 364nm e 488nm e detectada por meio dos filtros de 385nm e 485nm. **(A)** fluorescência do SpH na célula transfetada sob excitação 385nm. **(B)** sob excitação 485nm antes do tratamento. **(C)** depois do tratamento com CGS. **(D)** depois do tratamento com KCl. Setas brancas indicam pontos onde houve aumento na fluorescência após o tratamento. **(E)** CGS induziu aumento na fluorescência do SpH, o tratamento com ZM não alterou a linha basal da fluorescência. Após o tratamento com ZM, CGS não foi capaz de induzir o aumento na fluorescência do SpH. Por fim, KCl aumentou a fluorescência do SpH confirmando que a célula continuava responsiva à estímulos. A fluorescência foi normalizada pela razão entre a fluorescência do SpH sob excitação em 385nm e 485nm. Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, (n=4). U.A., unidades arbitrárias.

4.3-Curva Temporal: CGS induziu aumentos nos níveis do glutamato e noradrenalina na solução de trabalho

Evidências sugerem que a ativação do α_2 facilita a liberação de glutamato e noradrenalina no NTS (Castillo-Merendez *et al.*, 1994; Barraco *et al.*, 1995). Para avaliarmos se o tratamento com o agonista do α_2 facilita a liberação de GLU e NOR, foram analisados os níveis desses dois neurotransmissores na solução de trabalho antes e depois do tratamento com CGS.

As células tratadas com o agonista do α_2 CGS (10 μ M) apresentaram aumento mais pronunciado nos níveis do aminoácido glutamato na solução de trabalho nos tempos de 1, 3 e 5 segundos quando comparado com a situação controle (Figura 3). Por outro lado, 10 μ M de CGS induziu aumento nos níveis de noradrenalina na solução de trabalho de forma mais lenta quando comparado com a resposta observada nos experimentos de dosagem do glutamato. O nível de noradrenalina na solução de trabalho aumentou a partir de 3 s com o máximo de resposta em 5 s, seguido de aumentos de menor amplitude no tempo de 7 e 10 s em relação as respectivas situações controle (Figura 4).

Figura 3. Efeitos do tratamento com o agonista seletivo do α_2 sobre os níveis do glutamato na solução de trabalho em cultura de células do bulbo de ratos Wistar detectado através de cromatografia líquida de alta performance. As culturas foram submetidas à duas situações: **A** – somente com a solução de trabalho (controle) e **B** – solução de trabalho com a adição de CGS (10µM) por 1, 3, 5, 7 e 10 s. O tratamento com CGS por 1, 3 e 5 s induziu um aumento nos níveis de glutamato na solução de trabalho quando comparado com a situação controle. Os valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3). O tratamento aumentou a concentração do glutamato na solução de trabalho em resposta ao tratamento (*p<0,05) quando comparado com sua respectiva situação controle de acordo com o teste estatístico ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Bonferroni.

Figura 4. Efeitos do tratamento com o agonista seletivo do α_{2a} sobre os níveis de noradrenalina na solução de trabalho em cultura de células do bulbo de ratos Wistar detectado através de cromatografia líquida de alta performance. As culturas foram submetidas à duas situações: **A** – somente com a solução de trabalho (controle) e **B** – solução de trabalho com a adição de CGS (10µM) por 1, 3, 5, 7 e 10 s. O tratamento com CGS por 5 s induziu um aumento nos níveis de noradrenalina na solução de trabalho quando comparado com a situação controle. Os valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3). O tratamento aumentou a concentração de noradrenalina na solução de trabalho em resposta ao tratamento (*p<0,05) quando comparado com sua respectiva situação controle de acordo com o teste estatístico ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Bonferroni.

4.4-Curva concentração resposta: CGS aumentou os níveis do glutamato e noradrenalina da solução de trabalho de maneira dependente da concentração

As células foram tratadas com CGS nas concentrações de 0,1 à 100 μ M por 5 s a fim de estabelecer o EC₅₀ do fármaco. Foi observado um aumento gradual na resposta dependente da concentração ao CGS (Figura 5 e 6). Os dados foram normalizados com seus respectivos controles. O EC₅₀ para o glutamato foi 4,88 μ M / 0,044 e para noradrenalina 4,25 μ M / 0,048 (EC₅₀ / desvio padrão). Baseado nesses resultados e da curva temporal, foi adotado o tratamento com 5 μ M de CGS por 5 segundos nos experimentos seguintes, exceto no ensaio enzimático.

Os níveis extracelulares de glutamato podem também ser detectados através do ensaio enzimático com GDH e NAD⁺ em cultura de células do sistema nervoso central. Na presença de GDH, o glutamato reduz NAD⁺ em α -queroglutarato e NADH, o qual fluoresce quando excitado com luz ultravioleta (360nm) (Kawahara *et al.*, 2005). Interessantemente, no ensaio enzimático com GDH e NAD⁺, CGS (5 μ M) induziu uma elevação na fluorescência (dF/Fo) do NADH (Figura 7), sugerindo um aumento dos níveis de glutamato na solução de trabalho. As células foram também tratadas com CGS (5 μ M) na presença somente de GDH ou NAD⁺ para controle do ensaio da reação enzimática e não foi observado mudanças na fluorescência nessas células (Figura 8 A e B).

Figura 5. Curva concentração resposta do agonista seletivo do rA_{2a} sobre os níveis do glutamato na solução de trabalho em cultura de células do bulbo de ratos Wistar detectados através de cromatografia líquida de alta performance. As células foram tratadas com CGS nas concentrações entre 0,1 à 100 μ M por 5 segundos seguindo o mesmo modelo de situação (A e B) realizado nos experimentos de curva temporal. Os dados foram normalizados com seus respectivos controles. CGS aumentou de maneira dependente da concentração os níveis do glutamato na solução de trabalho ($EC_{50} = 4,88\mu$ M / desvio padrão=0,044). Os pontos são representados pela média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 6. Curva concentração resposta do agonista seletivo do rA_{2a} sobre os níveis da noradrenalina na solução de trabalho em cultura de células do bulbo de ratos Wistar detectados através de cromatografia líquida de alta performance. As células foram tratadas com CGS nas concentrações entre 0,1 à 100 μ M por 5 segundos seguindo o mesmo modelo de situação (A e B) realizado nos experimentos de curva temporal. Os dados foram normalizados com seus respectivos controles. CGS aumentou de maneira dependente da concentração os níveis da noradrenalina na solução de trabalho ($EC_{50} = 4,25\mu$ M / desvio padrão=0,048). Os pontos são representados pela média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 7. CGS induziu um aumento na razão dF/F_0 da fluorescência do NADH na solução de trabalho em cultura de células do bulbo de ratos Wistar. A enzima GDH na presença de GLU reduz NAD^+ em NADH que fluoresce quando excitado com luz UV. Imagens foram obtidas através do microscópio Axioinvert LSM 510 na objetiva a óleo 40x com o filtro de 505nm e o intervalo entre cada quadro foi de 0,5 s, barra de escala 50 μ m. **(A)** imagem das células somente com a luz transmitida. **(B)** adição de GDH e NAD^+ na solução de trabalho. **(C e D)** células tratadas com CGS (5 μ M). **(E)** CGS induziu aumento na fluorescência do NADH. Os pontos são representados pela média $\pm$ desvio padrão da razão dF/F_0 , onde F_0 representa a fluorescência antes do tratamento e dF representa depois do tratamento (n=4). Após estabilização da linha de base, a fluorescência basal foi determinada pela média dos dez primeiros pontos.

Figura 8. Culturas de células do bulbo de ratos Wistar tratadas com CGS e GDH ou CGS e NAD⁺. Imagens foram obtidas através do microscópio Axioinvert LSM 510 na objetiva à óleo 40x com o filtro de 505nm e o intervalo entre cada quadro foi de 0,5 s. **(A)** células tratadas somente GDH e CGS. **(B)** células tratada somente com NAD⁺ e CGS. Não foram observadas mudanças na razão dF/F_o nas células tratadas com os fármacos. Os pontos são representados pela média $\pm$ desvio padrão da razão dF/F_o , onde F_o representa a fluorescência antes do tratamento e dF representa depois do tratamento ($n=3$). Após estabilização da linha de base, a fluorescência basal foi determinada pela média dos dez primeiros pontos.

4.5-ZM e H89 inibiram o aumento nos níveis de glutamato e noradrenalina na solução de trabalho evocado pelo CGS

Nos experimentos anteriores foram observados aumentos nos níveis de glutamato e noradrenalina em resposta ao tratamento com o agonista do α_2 . O próximo passo foi avaliar o efeito do tratamento com o antagonista do α_2 ZM (50 μ M). Inicialmente, as células foram tratadas somente com ZM, a qual não alterou os níveis do glutamato na solução de trabalho quando comparado com a situação basal. Por outro lado, quando administrado junto ao CGS (5 μ M) foi capaz de inibir o aumento nos níveis do glutamato evocado pelo agonista α_2 (Figura 9). Interessantemente, o mesmo padrão de resposta foi observado para os ensaios de análise dos níveis de noradrenalina em resposta ao estímulo com CGS e ZM (Figura 10). Esses dados sugerem que o α_2 está envolvido com o aumento nos níveis desses dois neurotransmissores na solução de trabalho.

A via clássica de sinalização intracelular ativação pelo α_2 é a do AMPc. A PKA e a EPAC são proteínas efetoras do AMPc que estão envolvidas na modulação na liberação de neurotransmissores em diversas áreas do sistema nervoso (Capogna *et al.*, 1995; Trudeau *et al.*, 1996; Trudeau *et al.*, 1998; Kashima *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2003; Kaneko e Takahashi., 2004). Desta forma, também tratamos as células com os inibidores e ativadores da PKA e EPAC associados com o tratamento com CGS.

Nas células tratadas simultaneamente com CGS (5 μ M) e o inibidor da PKA (H89, 5 μ M) foi observado uma diminuição nos níveis de glutamato e noradrenalina na solução de trabalho, quando comparados com as células tratadas

somente com CGS. Por outro lado, não foi observada uma redução nos níveis do glutamato e noradrenalina nas células tratadas com a combinação do CGS e o inibidor da EPAC (BFA, 5 μ M), quando comparado com células tratadas somente com CGS. Além disso, células tratadas simultaneamente com CGS e os inibidores da PKA e EPAC (H89 e BFA) apresentaram respostas similares às observadas nas células tratadas somente com CGS e H89 (Figura 9 e 10). Esse perfil de respostas sugerem que a PKA é a proteína efetora do AMPc envolvida no aumento dos níveis de glutamato e noradrenalina evocada pela ativação do α_2 na solução de trabalho.

As células tratadas com CGS e o ativador da PKA (6Bnz, 5 μ M) apresentaram um aumento nos níveis do glutamato e noradrenalina na solução de trabalho quando comparado com as tratadas somente com CGS. Resposta essa, não observada nas células tratadas com CGS e o ativador da EPAC (8pCPT, 5 μ M). As células tratadas simultaneamente com CGS e o ativador da PKA e EPAC (6Bnz e 8pCPT) apresentaram respostas similares às obtidas com as tratadas somente com CGS e 6Bnz (Figura 9 e 10).

Figura 9. Inibição da PKA aboliu o aumento do glutamato na solução de trabalho induzido pela ativação do receptor A_{2a} de adenosina em cultura de células do bulbo de ratos Wistar detectado através de cromatografia líquida de alta performance. As culturas foram tratadas com os fármacos CGS (5µM), ZM (50µM), H89 (5µM), BFA (5µM), 6Bnz (5µM) e 8pCPT (5µM) por 5 segundos. O antagonista do rA_{2a} (ZM) inibiu o aumento nos níveis de glutamato na solução de trabalho ativada pelo CGS. Somente o inibidor da PKA (H89) inibiu o aumento nos níveis do glutamato evocado pelo CGS. O ativador da PKA (6Bnz) potencializou o aumento nos níveis do glutamato quando administrado junto ao CGS. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão (n=4). *p<0,05 quando comparado com controle; †p<0,05 quando comparado com tratadas somente com CGS de acordo com o teste estatístico ANOVA de uma via seguido do pós-teste Bonferroni.

Figura 10. Inibição da PKA aboliu o aumento da noradrenalina na solução de trabalho induzido pela ativação do receptor A_{2a} de adenosina em cultura de células do bulbo de ratos Wistar detectado através de cromatografia líquida de alta performance. As culturas foram tratadas com os fármacos CGS (5µM), ZM (50µM), H89 (5µM), BFA (5µM), 6Bnz (5µM) e 8pCPT (5µM) por 5 segundos. O antagonista do rA_{2a} (ZM) quando administrado junto ao CGS foi capaz de inibir o aumento nos níveis de noradrenalina na solução de trabalho ativada pelo agonista do rA_{2a} . Somente o inibidor da PKA (H89) inibiu o aumento nos níveis da noradrenalina evocado pelo CGS. O ativador da PKA (6Bnz) realçou o aumento nos níveis da noradrenalina quando administrado junto ao CGS. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=4). *p<0,05 quando comparado com controle; †p<0,05 quando comparado com tratadas somente com CGS de acordo com o teste estatístico ANOVA de uma via seguido do pós-teste Bonferroni.

4.6-CGS aumentou os níveis de sinapsina I fosforilada

A isoforma da sinapsina I é a fosfoproteína sináptica mais abundante em neurônios de mamíferos (Ferreira e Rapoport., 2002) e está envolvida no controle da transição da vesícula sináptica do agrupamento de reserva para o pronto para ser liberado na zona ativa por meio de regulação dependente de fosforilação da ligação da VS com os filamentos de actina do citoesqueleto (Bonanomi *et al.*, 2005). Nove sítios para fosforilação foram identificados na sinapsina I, sendo o sítio I localizado no resíduo serina na posição 9 (ser₉) fosforilado pela PKA (Cesca *et al.*, 2010).

A técnica de In-Cell Western tem sido utilizada no estudo da fosforilação de proteínas devido sua alta sensibilidade e precisão (Aguilar *et al.*, 2010). Desta forma, nós utilizamos a técnica ICW para a análise dos níveis da fosforilação da sinapsina I ser₉ em resposta ao tratamento com CGS. As culturas de células foram tratadas com 5µM de CGS por 5, 10, 20, 40, 80 e 160 segundos. Foi observado um aumento nos níveis da sinapsina I ser₉ fosforilada somente nas células expostas ao fármaco por 5 s em relação à situação controle (Figura 11). É importante destacar que em astrócitos não diferenciados são encontrados níveis baixo de expressão de sinapsina I, os quais reduzem significativamente durante a diferenciação (Maienschein *et al.*, 1999). Isso sugere que a fluorescência da marcação da sinapsina I é proveniente somente dos neurônios nas culturas analisadas.

Figura 11. CGS aumenta os níveis de fosforilação da sinapsina I ser₉ em culturas de células do bulbo de ratos Wistar através ICW. As células foram tratadas com 5 μ M de CGS por 5, 10, 20, 40, 80 e 160 segundos. O sinal da marcação com o anticorpo anti-sinapsina I ser₉ aparece em fluorescência verde, enquanto o sinal da anti-sinapsina I em fluorescência vermelha. CGS aumentou a fosforilação da sinapsina I no resíduo serina₉ em relação ao controle somente no tempo de 5 s. Os dados foram normalizados dividindo as intensidades das fluorescências da sinapsina I ser₉ pela sinapsina I e são representados pela média $\pm$ desvio padrão (n=3), *p<0,05 quando comparado com controle de acordo com o teste estatístico ANOVA de uma via seguido do pós-teste Dunnett.

4.7-PKA medeia aumento na fosforilação da sinapsina I

Nos resultados anteriores, foram demonstrado que somente a inibição da PKA aboliu o aumento dos níveis dos neurotransmissores glutamato e noradrenalina na solução de trabalho em resposta a ativação dos receptores A_{2a} de adenosina (Figura 9 e 10). Além disso, CGS aumentou a fosforilação da proteína sinapsina I (Figura 11). Portanto, fomos avaliar o papel da PKA na fosforilação da sinapsina I.

As células foram tratadas com CGS, ZM, H89 e 6Bnz nas mesmas concentrações utilizadas nos experimentos de dosagem dos neurotransmissores glutamato e noradrenalina por 5 s. Como esperado, CGS induziu um aumento na fosforilação da sinapsina I ser₉ quando comparado com a situação controle. O tratamento somente com o antagonista do rA_{2a} não alterou os níveis de fosforilação da sinapsina I ser₉ quando comparado com a situação controle. Por outro lado, ZM aboliu o aumento da fosforilação da sinapsina I ser₉ evocada pelo CGS quando as células foram tratadas com ambos fármacos. A inibição da PKA também anulou o aumento na fosforilação da sinapsina I ser₉ mediado pelo CGS. No entanto, não foram observadas mudanças significativas nos níveis da fosforilação da sinapsina I se₉ quando as células foram tratadas com o ativador da PKA (6Bnz) e CGS em comparação com as tratadas somente com CGS (Figura 12).

Figura 12. PKA medeia aumento na fosforilação da sinapsina I ser₉ evocado pelo tratamento com CGS em culturas de células do bulbo de ratos Wistar através ICW. As células foram tratadas com CGS, ZM, H89 e 6Bnz por 5 segundos. CGS induziu um aumento na fosforilação da sinapsina I no resíduo serina₉ em relação ao controle somente no tempo de 5 s. O inibidor da PKA (H89) aboliu o aumento na fosforilação da sinapsina I ser₉ induzida pelo CGS. O sinal da marcação com o anticorpo anti-sinapsina I ser₉ aparece em fluorescência verde, enquanto o sinal da anti-sinapsina I em fluorescência vermelha. Os dados foram normalizados dividindo as intensidades das fluorescências da sinapsina I ser₉ pela sinapsina I e são representados pela média $\pm$ desvio padrão (n=4), *p<0,05 quando comparado com controle; †p<0,05 quando comparado com tratadas somente com CGS de acordo com o teste estatístico ANOVA de uma via seguido do pós-teste Bonferroni.

DISCUSSÃO

O sistema de sinalização adenosinérgico é amplamente encontrado nas espécies do reino *animalia* e *plantae* (Burnstock e Verkratsky., 2009). A adenosina tem sido descrita como um importante modulador e metamodulador do sistema nervoso central (Sebastião e Ribeiro., 2009). Atualmente, são propostas duas fontes da adenosina extracelular: 1) gerada no ambiente intracelular e “liberada” através de transportadores; ou 2) por meio do metabolismo do ATP liberado no meio extracelular, sendo a segunda responsável pela geração da maior quantidade de adenosina extracelular (Fredholm *et al.*, 2011).

A disponibilidade extracelular da adenosina é determinada pelo equilíbrio entre a velocidade de degradação do ATP pelas ecto-nucleotidases e a proporção da liberação do ATP e adenosina (Sperlágh e Vizi., 2007). Há de se ressaltar que todas as células metabolicamente ativas são capazes de produzir ATP e, este, é liberado sob condições fisiológicas e fisiopatológicas (Zhang *et al.*, 2007; Elliott *et al.*, 2009).

Além disso, as ecto-nucleotidases rapidamente removem o grupamento fosfato do ATP extracelular. A primeira das enzimas a agir é a da família das NTPases (do inglês, *nucleoside triphosphate diphosphohydrolases*) (*e.g.*, CD39), seguido da hidrólise pela ação da ecto- 5' – nucleotidase (CD73) (Yegutkin., 2008). Tal como, a inibição dessas ecto-nucleotidases diminui significativamente os níveis de adenosina extracelular (Pascual *et al.*, 2005).

No sistema nervoso central, a principal fonte de adenosina é ATP liberado no espaço extracelular proveniente dos astrócitos (gliotransmissão) e não dos neurônios como era postulado (Pascual *et al.*, 2005). Uma vez liberado no espaço extracelular, o ATP pode ser convertido em adenosina em questão de

milesegundos (Wei *et al.*, 2011). Os níveis de adenosina extracelular variam dependendo do tecido, entretanto, estima-se uma concentração de 10 à 200 nM em condições basais (Ballarín *et al.*, 1991; Dunwidie., 1997; Rivkees *et al.*, 2001)²². Sobre condições fisiopatológicas, *e.g.*, hipóxia e isquemia a concentração de adenosina extracelular pode alcançar valores de até 30µM (Latini *et al.*, 1999).

A adenosina é um neuromodulador clássico, ou seja, ela não ativa diretamente as respostas neurais, mas, ao invés, promove o ajuste da transmissão sináptica. É importante, também, destacar a natureza ubíqua da adenosina, a capacidade de seus receptores em interagir com outros receptores e transportadores, assim como os múltiplos efeitos regulatórios no SNC.

De fato, a adenosina está envolvida em diversos processos fisiológicos no SNC, assim como o desequilíbrio em sua via de sinalização pode contribuir com o surgimento de disfunções neurológicas. É sabido que uma das substâncias psicoativas mais consumidas no mundo, a cafeína, é um antagonista dos receptores para adenosina e a maioria das suas ações biológicas são atribuídas à essa interação. Desta forma, os estudos dos efeitos da cafeína no SNC permitiu estabelecer a relação dos receptores adenosinérgicos com o ciclo sono vigília, o aprendizado, assim como com algumas doenças neurodegenerativas (Ribeiro e Sebastião., 2010).

A ação direta da adenosina sobre os receptores adenosinérgicos pré-sinápticos regulando a liberação de neurotransmissores é considerada o “ajuste” da transmissão sináptica. A modulação na liberação de NT vem sendo extensamente estudada devido sua relevância fisiológica no SNC. O excesso de

²² De acordo com Zetterström e coautores (1982) os níveis de adenosina no cérebro podem alcançar valores entre 1 e 2 µM em condições basais.

neurotransmissores na sinapse causa uma hiperestimulação dos neurônios pós-sináptico, que pode levar essa célula à morte, portanto, a diminuição na liberação de NT gera uma resposta neuroprotetora (Cunha., 2005). Além disso, tanto o aumento quanto a diminuição da liberação são mecanismos envolvidos na formação de LTP e LTD, processos importantes na formação da memória (Castillo., 2012).

É importante destacar que a primeira evidência do efeito modulatório da adenosina sobre a liberação de neurotransmissores aconteceu de forma indireta. Isso porque, em seus estudos, Ginsborg e Hirst (1971 e 1972) tiveram como objetivo avaliar a influência do AMPc na liberação de NT, ou seja, a adenosina foi utilizada somente como uma mera ferramenta de indução do aumento da concentração do AMPc intracelular. Contudo, surpreendente, eles observaram uma diminuição na liberação de neurotransmissores.

É sabido que a adenosina diminui a liberação de neurotransmissores via ativação dos RA_1 e aumenta mediado pelo RA_{2a} (Marchi *et al.*, 2002; Quata *et al.*, 2004). Há de se ressaltar, também, que ambos receptores podem coexistir na mesma terminação sináptica tanto na forma de monômeros quanto em heterodímeros (Lopes *et al.*, 2002; Ciruela *et al.*, 2006), ou seja, a adenosina pode aumentar e diminuir a liberação de neurotransmissores em uma mesma terminação sináptica dependendo do receptor ativado no momento.

Em condições basais, baixas concentrações de adenosina preferencialmente estimulam RA_1 e conseqüentemente se observa o efeito inibitório da transmissão sináptica (Fredholm *et al.*, 2001). Por outro lado, ainda em condições basais, a elevação da concentração de adenosina favorece a ativação dos RA_{2a} em terminais

sinápticos que possuem ambos receptores, na forma de monômeros (hipocampo) (Cunha e Ribeiro., 2000a) e heterodímeros (núcleo estriado) (Ciruela *et al.*, 2006). Nessas duas regiões, a ativação do rA_{2a} facilita a liberação de NT por meio de diminuição da atividade do A_1 . Portanto, esses dados sugerem que a concentração da adenosina está envolvida diretamente com sua ação depressora ou facilitadora da transmissão sináptica.

No sistema nervoso central, a ativação do rA_{2a} facilita o processo de exocitose de neurotransmissores em diversas áreas do SNC, tais como hipocampo (Cunha *et al.*, 1995; Jin e Fredholm., 1997; Rebola *et al.*, 2000; Cunha e Ribeiro., 2000b), o estriado (Kirk e Richardson., 1994; Popoli *et al.*, 1995), o globo pálido (Mayfield *et al.*, 1993; Ochi *et al.*, 2000) e o núcleo do trato solitário (Castillo-Melendez *et al.*, 1994; Barraco *et al.*, 1995; Scislo e O'Leary., 2006), cujo papel fisiológico pode estar relacionado com alguns aspectos no ajuste do sinal conforme a demanda e nos mecanismos envolvidos na plasticidade sináptica.

Sabendo disso, o estudo modulatório da liberação de neurotransmissores mediado pelos rA_{2a} é um excelente modelo experimental para o entendimento desse fenômeno *per se*, assim como permite avaliar alguns mecanismos relacionados com a neurotransmissão, uma vez que a via de sinalização intracelular ativado por esse receptor interage com o aparato neurosecretório.

Do ponto de vista histórico, é possível correlacionar alguns métodos com a elaboração de importantes conceitos na neurotransmissão e neuromodulação. As observações anatômicas macroscópicas do sistema nervoso permitiram detalhar suas estruturas (Vesalius., 1553 e 1555; Willis., 1664). Posteriormente, a

eletrofisiologia forneceu os meios para a detecção das variações elétricas utilizadas pelos nervos para a transmissão do sinal (Galvani., 1771).

A microscopia e técnicas citohistológicas contribuíram com a elaboração de hipóteses sobre a forma de comunicação entre os neurônios como, por exemplo, a teoria reticular e a doutrina do neurônio (Kölliker., 1852; Golgi., 1873; Cajal., 1888a,b). O aperfeiçoamento das técnicas farmacológicas e neurofisiológicas permitiu identificar algumas moléculas, as quais possuam efeitos sobre o funcionamento dos neurônios e, desta forma, foram fundamentais na elaboração do conceito da neurotransmissão química (Schmiedeberg e Koppe., 1869; Elliott., 1904; Langley., 1905; Loewy., 1921; Dale e Duley., 1929; Eccles., 1964). Além disso, outras técnicas, *e.g.*, *voltage clamp*, microscopia eletrônica, marcação histoquímica foram importantes para a compreensão de diversos mecanismos envolvidos na neurotransmissão (Hodgkin *et al.*, 1952; Palade e Palay., 1954; De Robertis e Bennett., 1955; Axelrod., 1954; Carlsson *et al.*, 1958).

Nesse contexto, nas últimas duas décadas, uma técnica vem se destacando no estudo da neurotransmissão e neuromodulação, a optgenética (Miesenböck., 2009; Henderson., 2009; Berdyeva e Reynolds., 2009; Diesseroth., 2011). A optogenética permite a construção de sensores biosintéticos que transformam sinais fisiológicos das células em sinais óticos e assim tornam o funcionamento celular visível. Em outras palavras, o sinal originado desses sensores demonstram as variações fisiológicas através de mudanças na intensidade da fluorescência. Atualmente, existem sensores para a análise da concentração do Ca^{2+} , segundos mensageiros, potencial de membrana, pH e liberação de vesícula sináptica (Cohen

e Salzberg, 1978; Zhang *et al.*, 2002; Miesenböck e Kevrekidis, 2005; Miyawaki, 2005).

Além disso, a optogenética também está sendo utilizada para fins modulatórios da própria fisiologia dos neurônios, ou seja, através dessa técnica é possível contruir proteínas transmembrânicas as quais respondem à um determinado comprimento de onda da luz. A fotoestimulação pode alterar o funcionamento dessa proteína, *e.g.*, a cotransfecção do receptor rodopsina do tipo 2 que forma canal iônico (ChR2, do inglês *channel rhodopsin- 2*) e o fotorreceptor presente na bactéria arqueia *natronomonas pharaonis* NpHR (do inglês *halorhodopsin*) em neurônios do hipocampo de mamíferos, produz despolarização neuronal via ativação dos ChR2 estimulado pela luz azul e hiperpolarização mediada pelo NpHR quando estimulado com a luz amarela (Zhang *et al.*, 2007).

No estudo ótico das propriedades da neurotransmissão e neuromodulação, diversos sensores biosintéticos foram projetados, os quais permitiram a visualização de importantes mecanismos fisiológicos envolvidos nesse fenômeno como, por exemplo, exocitose e endocitose das VSs, registro do potencial de ação, localização e movimento das proteínas fusiogênicas (Sjulson e Miesenböck, 2007; Taraska e Zagotta, 2010; Dreosti e Lagnado, 2011).

No Brasil, o presente trabalho foi pioneiro na utilização do supereclipse sinapto-pHluorina nos estudos da modulação na liberação de neurotransmissores (Miesenböck *et al.*, 1998). O SpH em pH ácido permanece no estado apagado, somente acendendo em pH acima de 7. Como é sabido, as vesículas sinápticas possuem o pH ácido devido a H⁺ ATPase contida em sua membrana (Atluri e Ryan, 2006). Então, uma vez transfectada, a célula passa a produzir o SpH, que no

interior da vesícula fica no estado apagado e, assim que essa vesícula é liberada na junção sináptica em resposta à um estímulo, o SpH se acende. Utilizando-se de microscopia confocal, essa técnica nos permitiu a visualização da liberação de vesículas sinápticas em resposta aos tratamentos com o agonista do rA_{2a} em células da região do bulbo.

O tratamento com CGS aumentou a fluorescência do SpH sugerindo que a estimulação dos rA_{2a} na cultura de células do bulbo pode agir como modulador da liberação de neurotransmissores. Colaborando com esse dado, foi demonstrado que a ativação do rA_{2a} no NTS, localizado no bulbo, facilita a liberação de neurotransmissores em modelos *in vivo* (Castillo-Melendez *et al.*, 1994; Barraco *et al.*, 1995; Scislo e O'Larry., 2006). Contudo, é plausível considerar que o CGS induziu o aumento na fluorescência do SpH de forma indireta, uma vez que o fármaco pode agir em outras células da cultura (neurônios ou glias) e estas estariam estimulando a célula transfectada.

No NTS, microinjeções de adenosina promovem diminuição na frequência cardíaca e da pressão arterial média (Tseng *et al.*, 1988). No entanto, há de se ressaltar que a adenosina não é um neurotransmissor e, portanto, não consegue transmitir diretamente o sinal necessário para modificar o funcionamento desse núcleo, ou seja, o efeito modulatório da adenosina sobre a liberação de neurotransmissores pode explicar seu efeito depressor da pressão arterial no NTS.

A ação da adenosina na facilitação da liberação de neurotransmissores vem sendo estudada em diversos modelos experimentais (Cunha *et al.*, 1995; Cunha e Ribeiro., 2000a), incluindo os estudos clássicos da ação da adenosina como modulador da liberação de glutamato (Castillo-Melendez *et al.*, 1994) e

noradrenalina (Barraco *et al.*, 1995) no NTS. Desta forma, nosso próximo passo foi avaliar se a ativação do α_{2a} também modula a liberação desses dois neurotransmissores.

O agonista seletivo do α_{2a} aumentou os níveis de glutamato e noradrenalina na solução de trabalho em cultura do bulbo com uma maior amplitude de resposta em 5 s. Há de se ressaltar, também, que quando comparamos o perfil de resposta modulatória do glutamato ao CGS com a da noradrenalina, observamos um aumento expressivo do glutamato já no tempo de 1 e 3 s, enquanto a noradrenalina somente aumentou seus níveis no tempo de 3 e 5 s.

É possível que parte do glutamato detectado na solução de trabalho é proveniente da gliotransmissão. Sabe-se que o próprio glutamato liberado pelo terminal pré-sináptico ativa receptores ionotrópicos e metabotrópicos glutamatérgicos nos astrócitos que margeam essa sinapse. Em resposta a esse estímulo, o astrócito promove a liberação de glutamato na região sináptica e extrasináptica (Theodosis *et al.*, 2008).

A liberação do glutamato das fibras aferentes do baroreceptores (Gordon e Sved, 2002) e de noradrenalina dos neurônios catecolinérgico A2 da região subpostrema do NTS diminuem a frequência cardíaca e a pressão arterial (Van Giersbergen *et al.*, 1992). Evidências funcionais e anatômicas sugerem a presença do α_{2a} nos terminais sinápticos das fibras aferentes do baroreceptores (Castillo-Melendez *et al.*, 1994), assim como o CGS se liga com alta afinidade aos α_{2a} localizados na região subpostrema do NTS, os quais aumentam a liberação de [3 H] noradrenalina nessa área (Barraco *et al.*, 1995). Desta forma, é possível

correlacionar o efeito hipotensor da adenosina com esses dois sistemas de neurotransmissão envolvidos na diminuição da pressão arterial no NTS.

Quando analisamos os dados sob o aspecto da transmissão sináptica *per se* é possível que o aumento nos níveis de glutamato e noradrenalina, em resposta ao tratamento com CGS, esteja relacionado à plasticidade sináptica, uma vez que, ao nível pré-sináptico, um mecanismo envolvido na modulação do tamanho da sinapse a curto prazo é o aumento na liberação de neurotransmissores (Leenders e Sheng, 2005). Além disso, diversos trabalhos demonstram que as sinapses nos circuitos neurais do NTS possuem um grau elevado de plasticidade, em parte, devido às características integrativa e modulatória desse núcleo (Zhou *et al.*, 1997; Bonham *et al.*, 2006; Zhang e Mifflin, 2010). Portanto, pode ser que a facilitação da liberação de neurotransmissores no NTS seja um mecanismo de plasticidade sináptica.

Em situação basal, os níveis de glutamato se mantiveram estáveis até 5 s decaindo nos segundos seguintes, enquanto que os níveis de noradrenalina tiveram uma diminuição gradual ao longo do tempo analisado.

Essa diferença entre o padrão de diminuição das concentrações de glutamato e noradrenalina em situação basal em função do tempo pode estar acontecendo porque cada sistema de neurotransmissão possui cinética e mecanismos distintos de síntese, armazenamento, liberação e recaptação.

Sabe-se que glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos podendo ser encontrado em concentrações de milimolar na substância cinzenta do sistema nervoso central (Arundine e Tymianski, 2003).

O glutamato pode agir em receptores ionotrópicos, estes mais abundantes no SNC e metabotrópicos que possuem diversos subtipos, tais como, AMPA, NMDA e Kainato (ionotrópicos); e mGluR1, mGluR3 e mGluR5 (metabotrópicos). A ativação excessiva dos receptores glutamatérgicos, especialmente os ionotrópicos, pode resultar em disfunção e morte celular, conhecida como excitotoxicidade (Sims e Zaidan., 1995). No entanto, a célula possui diversos mecanismos regulatórios rápidos e eficazes que evitam a excitotoxicidade, desde o tráfego e funcionamento dos seus receptores pós-sinápticos (Huydhe *et al.*, 2011), assim como por difusão e recaptação do glutamato (Mashino *et al.*, 2010).

Por outro lado, a noradrenalina age somente em receptores metabotrópicos (α e β -adrenérgicos), sendo esses tipos de receptores menos lesivos em caso de altas concentrações do neurotransmissor, já que receptores acoplados a proteína G possuem diferentes recursos de regulação como, por exemplo, o mecanismo de dessensibilização pela β -arrestina (DeWire *et al.*, 2007) que permitem manter o sistema em equilíbrio mesmo por mais tempo em comparação com ionotrópicos.

Quando comparamos o mecanismo de recaptação dos dois neurotransmissores, um mecanismo que pode explicar essa diferença é o processo de regulação entre o neurônio e células da glia a qual mantém baixas as concentrações do glutamato extracelular por meio da recaptação desse neurotransmissor pela glia (Tsai *et al.*, 2012), enquanto no caso da noradrenalina esse processo é realizado somente por transportadores nos terminais noradrenérgicos (Sanders *et al.*, 2005).

Com o tempo estabelecido, partimos para os experimentos de curva concentração-resposta. Os valores de EC₅₀ do CGS para glutamato e noradrenalina

foram próximos, sugerindo assim, mecanismos similares envolvidos na liberação desses neurotransmissores em cultura de células.

A ativação do rA_{2a} promove um aumento na produção de AMPc, que é uma importante via de regulação do ciclo celular, tais como proliferação, diferenciação, regulação da dinâmica dos microtúbulos, fluxo de íons, controle de exocitose e modulação das respostas imunes (Tasken e Aandahl., 2004).

O primeiro efector do AMPc conhecido foi a PKA, embora recentemente, outros efetores foram descritos como, por exemplo, a EPAC (De Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998) e os canais iônicos ativados por nucleotídeos cíclicos (CNG, do inglês cyclic nucleotide-gated cation channels) (Broillet e Firestin., 1999).

A mais bem descrita interação do AMPc é com a PKA. A PKA foi descoberta no laboratório de Edwin G. Krebs em 1968 (Walsh *et al.*, 1968 apud Murray., 2008). Desde então, diversos processos celulares vem sendo descritos ao longo dessas décadas, incluindo a regulação de outras proteínas cinase, regulação da concentração do cálcio e da transcrição gênica.

A PKA é um heterotetrâmero composto de duas subunidades regulatórias (R) e duas catalíticas (C). Foram identificadas duas isoformas nomeadas de tipo I e II (Taylor *et al.*, 2004). São necessárias quatro moléculas de AMPc nas subunidades regulatórias da PKA para que ocorra mudanças conformacionais, que por sua vez, dissocia a molécula em subunidades constituída por um dímero regulatório e outros dois monômeros catalíticos tornando-se cataliticamente ativo (Johannes., 2006).

Comparado com a PKA a família GEF/EPAC foi descoberta recentemente (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). Entretanto, vem crescendo o número de

trabalhos que descrevem um papel importante do GEF/EPAC na fisiologia celular (Holz *et al.*, 2006). EPAC é uma proteína de troca ativada diretamente pelo AMPc que interage com Ras GTPases (de Jesus *et al.*, 2006), proteínas associadas ao microtúbulo (Yarwood., 2005) e Rim 2 e Piccolo (Ozaki *et al.*, 2000; Fujimoto *et al.*, 2002; Shibasaki *et al.*, 2004).

Existem duas isoformas de EPAC, a tipo 1, mais abrangente, encontrada em maior quantidade no cérebro, coração, rins, pâncreas, tireoide e na medula espinal, enquanto a tipo 2 é menos proeminente e encontrada em discretas regiões do cérebro, nas adrenais, fígado e nas ilhotas de Langerhans no pâncreas (Ueno *et al.*, 2001). A EPAC1 contém um único domínio de ligação para o AMPc, enquanto EPAC2 possui dois (um de baixa afinidade ao AMPc chamada de A e um de alta afinidade ao AMPc chamada de B) (Johannes., 2006).

Desde que Greengard e coautores (1970) demonstraram que a atividade neural aumentava os níveis de AMPc nos gânglios cervicais superiores, o AMPc se tornou alvo de diversos estudos que associaram esse fenômeno com um aumento na liberação de neurotransmissores em terminais pré-sinápticos (Weisskopf *et al.*, 1994; Lebmann e Heumann., 1997).

Classicamente, o aumento na liberação de neurotransmissores mediado pelo AMPc foi atribuído a ativação da PKA (Castellucci *et al.*, 1980; Chavez-Noriega e Stevens., 1994). Pois, a PKA não só inibe o funcionamento dos canais de potássio modificando o potencial de membrana da célula (Siegelbaum *et al.*, 1982), como também regula a dinâmica vesicular por meio da fosforilação de proteínas envolvidas na liberação de neurotransmissores, tais como a sinapsina I (Menegon *et al.*, 2006) e a SNAP25 (Nagy *et al.*, 2004).

Entretanto, importantes estudos começaram a demonstrar que outro efector do AMPc, a EPAC estava envolvida na modulação de processos secretórios, tais como, na secreção de insulina pelas células Beta (Holz., 2004), nos melanotrófos (Sedej *et al.*, 2005), na junção neuromuscular do lagostin (Zhong e Zucker., 2005), na sinapse axosomática gigante chamada de cálice de Held (Sakaba e Neher., 2003) e neurônios corticais (Huang e Hsu., 2006). Sabendo disso, fomos analisar o papel da PKA e EPAC no aumento da concentração de glutamato e noradrenalina na solução de trabalho evocada pela ativação do α_2 .

Nossos dados obtidos por meio da dosagem do glutamato e noradrenalina na solução de trabalho após os tratamentos demonstraram que o antagonista do α_2 (ZM) foi capaz de inibir o aumento do glutamato e noradrenalina mediado pelo CGS, sugerindo assim, que essa resposta observada foi mediada pelo α_2 .

O tratamento com o inibidor da PKA aboliu o aumento nos níveis de glutamato e noradrenalina na solução de trabalho mediado pela ativação do α_2 . Por outro lado, não foi observado mudança na resposta quando as células foram tratadas com CGS junto com o inibidor da EPAC. Adicionalmente, somente o ativador da PKA foi capaz de aumentar a resposta observada em função do tratamento com o CGS, sugerindo que o efector do AMPc ativado em resposta ao tratamento com CGS em cultura de células do bulbo é a PKA.

Uma possível explicação para a ativação da PKA é a localização dessa proteína efetora do AMPc no compartimento celular. Sabe-se que a estimulação do receptor acoplado a proteína G_s regula positivamente a atividade da enzima adenilil ciclase que por sua vez aumenta concentração do AMPc, isto é, o aparato para a formação do gradiente de AMPc está localizado próximo à proteína G. A

proteína AKAP (do inglês, *A kinase anchoring protein*) está localizada na vizinhança da proteína G e da adenilil ciclase. Ela liga-se a PKA com alta afinidade deslocando a PKA para a região próxima ao gradiente de AMPc (Taskén e Aangdhal., 2004). Desta forma, a interação AKAP-PKA fornece uma rápida e específica rota de sinalização intracelular para o AMPc.

É interessante ressaltar que a modulação da liberação de neurotransmissores pela PKA tem sido descrito em diversos modelos experimentais como, por exemplo, em sinapse de lula gigante (Trudeau *et al.*, 1996), em fatias e cultura de neurônios do hipocampo (Chen e Roper., 2003; Hifilker *et al.*, 2001) e em neurônios do cerebelo (Lonart *et al.*, 2003). A fosforilação de proteínas envolvidas no processo de exocitose de vesículas sináptica pela PKA é um importante mecanismo regulatório da liberação de neurotransmissores mediado pelo AMPc.

A proteína sinapsina I é um conhecido substrato para fosforilação pela PKA (Greengard *et al.*, 1987). A sinapsina I liga a vesícula sináptica aos filamentos de actina do citoesqueleto no estado desfosforilado. A fosforilação da sinapsina I está envolvida na regulação da disponibilidade da VS nos terminais pré-sinápticos. Esse mecanismo é importante para a formação e manutenção do reservatório de reserva, tal como para o ajuste do equilíbrio entre os reservatórios de reserva e o pronto para ser liberado (Bykhovskaia., 2011).

É sabido que o resíduo serina na posição 9 da sinapsina I denominado de sítio 1, é fosforilado pela PKA e proteína cinase dependente do complexo Ca^{2+} / calmodulina (Chi *et al.*, 2001). Entretanto, é importante destacar que em neurônios

do hipocampo a fosforilação da sinapsina I no sítio 1 é preferencialmente mediado pela PKA (Menegon *et al.*, 2006).

Para avaliarmos a fosforilação da sinapsina I pela PKA, foram analisados os níveis da sinapsina I ser₉ e da sinapsina I. A razão entre essas proteínas foi utilizada para determinar a fosforilação da sinapsina I no sítio 1.

Foi observado que o tratamento com CGS aumentou a fosforilação da sinapsina I, tal qual o inibidor da PKA (H89) anulou essa resposta. Desta forma, é possível que a elevação da fosforilação da sinapsina I pela PKA esteja envolvida no aumento dos níveis de glutamato e noradrenalina na solução de trabalho observado em resposta à ativação do rA_{2a}.

Embora não exista comprovação de que a fosforilação da sinapsina I aumente diretamente a liberação de neurotransmissores, algumas evidências sugerem que esse mecanismo pode influenciar o processo de exocitose, *e.g.*, a fosforilação da sinapsina I promove sua dissociação da VS no reservatório de reserva e aumenta a disponibilidade de vesículas para liberação (Valtorta *et al.*, 1992), assim eleva a exocitose de VS em cultura de neurônios de *aplisia* (Fiumara *et al.*, 2004). Culturas de células do hipocampo de camundongos *knockout* para sinapsina I, apresentaram uma redução das vesículas sinápticas na região pronta para liberação (Baldelli *et al.*, 2007). Além disso, Menegon e coautores (2006) demonstraram que a fosforilação da sinapsina I pela PKA potencializou a liberação de VS em neurônios do hipocampo.

É importante, também, comentar que a influência direta da fosforilação da sinapsina no tráfico da VS para a zona ativa ainda é um tema muito controverso. No entanto, a interação molecular entre a sinapsina e a Rab3a, uma proteína

citossólica, que está envolvida como o transporte da VS para a zona ativa deve ser considerada (Stenmark, 2009). Segundo Giovedì e coautores (2004a,b) a interação sinapsina/Rab3a promove a dissociação da VS do citoesqueleto e, também, estabiliza a ligação da Rab3a com a vesícula. Deste modo, esses mecanismos possivelmente preparam a VS para a interação com o aparato secretório da zona ativa e, assim, favorece a liberação de NT.

Em adição, a sinapsina também é encontrada associada com filamentos de actina em regiões em volta da zona ativa envolvida com o processo de endocitose de VS (Bloom *et al.*, 2003). Então, é proposto que nessa região a sinapsina é capaz de interagir com as VSs recentemente endocitadas redirecionando-as para o reservatório de reserva ou o pronto para ser liberado. Portanto, alguns trabalhos sugerem que a sinapsina está envolvida também nos estágios posteriores ao ancoramento da VS, os quais podem regular o tamanho do reservatório pronto para ser liberado facilitando a exocitose (Fassio *et al.*, 2006; Hvalby *et al.*, 2006; Coleman e Bykhovskaia, 2009).

Por fim, coletivamente, os dados apresentados no presente trabalho sugerem que a ativação dos receptores A_{2a} de adenosina em cultura de células do bulbo modula a liberação de vesículas sinápticas, os quais aumentam os níveis dos neurotransmissores glutamato e noradrenalina. Tal como, a fosforilação da proteína sinapsina I pela PKA pode ser o mecanismo envolvido nessa resposta.

CONCLUSÃO

Em cultura de células do bulbo de ratos Wistar.

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

- A ativação do receptor A_{2a} de adenosina: 1) modula a liberação de neurotransmissores; 2) aumenta os níveis de glutamato e noradrenalina; 3) eleva a fosforilação da sinapsina I.
- A inibição da PKA abole o aumento nos níveis de glutamato, noradrenalina e sinapsina I fosforilada observados em resposta à ativação do receptor A_{2a} de adenosina.
- A proteína EPAC não participa do aumento nos níveis de glutamato e noradrenalina mediada pela ativação do receptor A_{2a} de adenosina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agnati LF, Fuxe K, Zoli M, Ozini I, Toffano G, Ferraguti F. A correlation analysis of the regional distribution of central enkephalin and beta-endorphin immunoreactive terminals and of opiate receptors in adult and old male rats. Evidence for the existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume transmission and the wiring transmission. *Acta Physiol Scand.* 128: 201–207, 1986.

Agnati LF, Guidolin D, Guescini M, Genedani M, Fuxe K. Understanding wiring and volume transmission. *Brain Res Rev.* 64: 137-159, 2010.

Aguilar HN, Zielnik B, Tracey CN, Mitchell BF. Quantification of rapid myosin regulatory light chain phosphorylation using high-throughput In-Cell Western assays: Comparison to western immunoblots. *Plos One.* 5: e9965-e9976, 2010.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 10: 2129–2142, 1988a.

Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG. Calcium increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 18: 6822–6829, 1988b.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22: 208–215, 1999.

Aronson JK. “Where name and image meet”- the argument for “adrenaline”. *BMJ.* 320: 506-510, 2000.

Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium.* 34: 325-337, 2003.

Atluri PP, Ryan TA. The kinetics of synaptic vesicle reacidification at hippocampal nerve terminals. *J Neurosci.* 26: 2313-2320, 2006.

Axelrod J. Studies on sympathomimetic amines. II. The biotransformation and physiological disposition of D-amphetamine, D-P-hydroxyamphetamine and Dmethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 110: 315–326, 1954.

Axelrod J. Metabolism of epinephrine and other sympathomimetic amines. *Physiol Rev.* 39: 751–776, 1959.

Awapara J, Landua A, Fuerst R, Seale B. Free gammaaminobutyric acid in brain. *J Biol Chem.* 187:35–39, 1950.

Axelrod J, Whitby LG, Hertting G. Effects of psychotropic drugs on the uptake of H3-norepinephrine by tissues. *Science.* 133: 383–384, 1961.

Balaji J, Armbruster M, Ryan TA. Calcium control of endocytic capacity at a CNS synapse. *J Neurosci*. 28: 6742-6749, 2008.

Baldelli P, Fassio A, Valtorta F, Benfenati F. Lack of synapsin I reduces the readily releasable pool of synaptic vesicles at central inhibitory synapses. *J Neurosci*. 27: 13520-13531, 2007.

Ballarín M, Fredholm BB, Ambrosio S, Mahy N. Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand*. 142:97-103, 1991.

Bara-Jimenez W, Sherzai A, Dimitrova T, Favit A, Bibbiani F, Gillespie M, Morris MJ, Mouradian MM, Chase TN. Adenosine A_{2A} receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. *Neurology*. 61: 293-6, 2003.

Barañano DE, Ferris CD, Snyder SH. Atypical neural messengers. *Trends Neurosci*. 24: 99-107, 2001.

Barbara JG, Clarac F. Historical concepts on the relations between nerves and muscles. *Brain Res*. 1409: 3 – 22, 2011.

Bark IC, Wilson MC. Cloning of human cDNA clones encoding two different isoforms of the nerve terminal protein SNAP-25. *Gene*. 139: 291– 292, 1994.

Barraco RA, Clough-Helfman C, Goodwin BP, Anderson GF. Evidence for presynaptic adenosine A_{2a} receptors associated with norepinephrine release and their desensitization in the rat nucleus tractus solitarius. *J Neurochem*. 4: 1604-1611, 1995.

Barraco RA, Janusz CJ, Polasek PM, Parizon M, Roberts PA. Cardiovascular effects of microinjection of adenosine into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res Bull*. 20: 129-132, 1988.

Barraco RA, Phillis JW. Subtypes of adenosine receptors in the brainstem mediate opposite blood pressure responses. *Neuropharmacol*. 30: 403– 407, 1991.

Barrett EF, Stevens CF. Quantal Independence and uniformity of presynaptic release kinetics at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*. 277: 665-689, 1972.

Barszczewski M, Chua JJ, Stein A, Winter U, Heintzmann R, Zilly FE, Fasshauer D, Lang T, Jahn R. A novel site of action for α -SNAP in the SNARE conformation cycle controlling membrane fusion. *Mol Biol Cell*. 19: 776-784, 2008.

Bats C, Groc L, Choquet D. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron*. 53: 719-734, 2007.

Benfenati F, Greengard P, Brunner J, Bahler M. Electrostatic and hydrophobic interactions of synapsin I and synapsin I fragments with phospholipid bilayers. *J Cell Biol.* 108:1851–62, 1989.

Bennett MK, Calakos N, Scheller RH. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science.* 257:255–259, 1992.

Bennett MR. The concept of transmitter receptor: 100 years on. *Neuropharmacol.* 39: 523-546, 1999a.

Bennett MR. The early history of the synapse: from Plato to Sherrington. *Brain Res Bull.* 50:95-118, 1999b.

Berdyeva TK, Reynolds JH. The dawning of primate optogenetics. *Neuron.* 62: 159-160, 2009.

Bernard C. Leçons sur les effets des substances toxiques et medicamenteuses. Bailliere. Paris, 1857.

Betke KM, Wells CA, Hamm HE. GPCR mediated regulation of synaptic transmission. *Prog Neurobiol.* 96: 304-321, 2012.

Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Lodi Rizzini B, Pozzan T, Volterra A. Prostaglandins stimulates calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature.* 391: 281-285. 1998.

Bisserbe JC, Patel J, Marangos PJ. Autoradiographic localization of adenosine uptake sites in rat brain using [³H]nitrobenzylthioinosine. *J Neurosci.* 5: 544-550, 1985.

Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, de Camilli P, Südhof TC, Niemann H, Jahn R. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365: 160–163, 1993.

Bloom O, Evergren E, Tomilin N, Kjaerulff O, Low P, Brodin L, Pieribone VA, Greengard P, Shupliakov O. Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol.* 161: 737–747, 2003.

Bogaart G, Holt MG, Bunt G, Riedel D, Wouters FS, Jahn R. On eSNARE complex is sufficient for membrane fusion. *Nat Struc Mol Biol.* 10: 358-366, 2010.

Bonanomi D, Menegon A, Miccio A, Ferrari G, Corradi A, Kao HT, Benfenati F, Valtorta F. Phosphorylation of synapsin I by cAMP-dependent protein kinase controls synaptic vesicle dynamics in developing neurons. *J Neurosci.* 25:7299 – 7308, 2005.

- Bonham AC, Chen CY, Sekizawa S, Joad JP. Plasticity in the nucleus tractus solitaries and its influence on lung and airways reflexes. *J Appl Physiol.* 101: 322-327, 2006.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci.* 8: 1263-1268, 2005.
- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 682-685, 1990.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 9030-9033, 1989.
- Bresadola M. Medicine and science in the life of Luigi Galvani (1737-1798). *Brain Res Bull.* 46: 367-380, 1998.
- Brock LC, Combs JS, Eccles JC. The recording of potentials from motor neurons with an intracellular electrode. *J Physiol.* 41: 19-59, 1951.
- Broillet MC, Firestein S. Cyclic nucleotide-gated channels. Molecular mechanisms of activation. *Ann NY Acad Sci.* 868: 730-740, 1999.
- Brown DA, Sihra TS. Presynaptic signaling by heterotrimeric G-proteins. *Handb Exp Pharmacol.* 184: 207-260, 2008.
- Bruns D, Jahn R. Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature.* 377: 62-66, 1995.
- Burgoyne RD, Morgan A. Membrane trafficking: Three Steps to fusion. *Curr Biol.* 17: R255-259, 2007.
- Burke RE. John Eccles' pioneering role in understanding central synaptic transmission. *Prog Neurobiol.* 78: 173-188, 2006.
- Burkhardt P, Hattendorf DA, Weis WI, Fasshauer D. Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide. *EMBO J.* 27: 923-933, 2008.
- Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 24: 509-506, 1972.
- Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol.* 62: 491-503, 1976a.
- Burnstock G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience.* 1:239-48, 1976b.
- Burnstock G, Verkhratsky A. Evolution origins of the purinergic signaling system. *Acta Physiol.* 195: 415-447, 2009.

Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 87: 659-797, 2007.

Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Södhof TC. α -Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science.* 329: 1663-1668, 2010.

Burudi EM, Riese S, Stahl PD, Régnier-Vigouroux A. Identification and functional characterization of the mannose receptor in astrocytes. *Glia.* 25: 44-55, 1999.

Bykhovskaia M. Synapsin regulation of vesicle organization and function pools. *Seminars Cell Develop Bio.* 22: 387-392, 2011.

Cajal RS. Conexión general de los elementos nerviosos. *Med Práct.* 2: 341-346, 1889.

Cajal RS. Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev Ver Trim Hist Norm Patol.* 1: 1-10, 1888.

Cajal RS. Sobres las fibras nerviosas de la capa molecular Del cerebelo. *Rev Ver Trim Hist Norm Patol.* 1: 33-49, 1888b.

Cannon WB, Rosenblueth A. Sympathin E and I. *Am J Physiol.* 104: 557-574, 1933.

Capogna M, Gähwiler BH, Thompson SM. Presynaptic enhancement of inhibitory synaptic transmission by protein kinases A and C in the rat hippocampus in vitro. *J Neurosci.* 15: 1249-1260, 1995.

Carlos JÁ, Borrel J. A historical reflection of the contributions of Cajal and Golgi to the foundations of neuroscience. *Brain Res Rev.* 55: 8-16, 2007.

Carlsson A, Falck B, Fuxe K, Hillarp NA. Cellular localization of monoamines in the spinal cord. *Acta Physiol Scand.* 60: 112-119, 1964.

Carlsson A, Falck B, Hillarp NA. Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol Scand Suppl.* 56: 1-28, 1962.

Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science.* 127:471, 1958.

Carlsson A. The occurrence, distribution, and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev.* 11:490-493, 1959.

Carrettiero DC, Ferrari MFR, Fior-Chadi DR. Alpha2-adrenergic receptor distribution and density with the nucleus tractus solitarii of normotensive and hypertensive rats during development. *Auton Neurosci.* 166: 39-46, 2012.

Carrettiero DC, da Silva SM, Fior-Chadi DR. Adenosine modulates alpha2-adrenergic receptors through a phospholipase C pathway in brainstem cell culture of rats. *Auton Neurosci.* 3: 174-177, 2009.

Carrettiero DC, Fior-Chadi DR. Adenosine A₁ receptor distribution in the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Neural Transm.* 111: 465-473, 2004.

Carrettiero DC, Fior-Chadi DR. Age-dependent changes in adenosine A₁ receptor distribution and density within the nucleus tractus solitarii of normotensive and hypertensive rats. *J Neural Transm.* 115: 1109-1118, 2008.

Cassada DC, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Linden J, Rieger JM, Rosin D, Kron IL, Kern JA. Adenosine A_{2a} agonist reduces paralysis after spinal cord ischemia: correlation with A_{2a} receptor expression on motor neurons. *Ann Thorac Surg.* 74: 846-849, discussion 849-50, 2002.

Castellucci VF, Kandel ER, Schwartz JH, Wilson FD, Nairn AC, Greengard P. Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMPdependent protein kinase stimulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in Aplysia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77:7492–7496, 1980.

Castillo PE. Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4: a005728-a005752, 2012.

Castillo-Melendez M, Krstew E, Lawrence AJ, Jarrott B. Presynaptic adenosine A_{2a} receptors on soma and central terminals of rat vagal afferent neurons. *Brain Res.* 652: 137-144, 1994.

Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol.* 91: 313–348, 2010.

Chapman ER. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu Rev Biochem.* 77: 615–641, 2008.

Charles AC, Dirksen ER, Merrill JE, Sanderson MJ. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron.* 6: 983–992, 1991.

Chavez-Noriega LE, Stevens CF. Increased transmitter release at excitatory synapses produced by direct activation of adenylate cyclase in rat hippocampal slices. *J Neurosci.* 14: 310-307, 1994.

Chen C, Regehr WG. The mechanism of cAMP-mediated enhancement at a cerebellar synapse. *J Neurosci.* 22: 8687-8694, 1997.

Chen CY, Ling EH, Horowitz JM, Bonham AC. Synaptic transmission in nucleus tractus solitarius is depressed by group II and III but not group I presynaptic metabotropic glutamate receptors in rats. *J Physiol.* 583: 773–786, 2002.

Chen H, Kovar J, Sissons S, Cox S, Willian M, Chadwell F, Luan P, Vlahos CJ, Schutz-Geschwender A, Olive DM. A cell-based immunocytochemical assay for monitoring kinase signaling pathways and drug efficacy. *Anal Biochem.* 338: 136-142, 2005.

Chen HX, Roper SN. PKA and PKC enhance excitatory synaptic transmission in human dentate gyrus. *J Neurophysiol.* 89: 2482-2488, 2003.

Chen JF, Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH, Beilstein M, Sonsalla PK, Castagnoli K, Castagnoli N Jr, Schwarzschild MA. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:RC143, 2001.

Chevalleyre V, Takahashi KA, Castillo PE. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci.* 29: 37–76, 2006.

Chi P, Greengard P, Ryan TA. Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity. *Nat Neurosci.* 4: 1187–1193, 2001.

Chow RH, von Ruden L, Neher E. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature.* 356: 60– 63, 1992.

Ciruela F, Casadó V, Rodrigues RJ, Lujan R, Burguenõ J, Canals M, Borycz J, Rebola N, Goldberg SR, Mallol J, Cortés A, Canela EI, Lopez-Gimenez JF, Milligan G, Lluís C, Cunha RA, Ferré S, Franco R. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A₁–A_{2a} receptor heteromers. *J Neurosci.* 26: 2080–2087, 2006.

Clarac F, Pearlstein. Invertebrate preparations and their contribution to neurobiology in the second half of the 20th century. *Brain Res Rev.* 54: 113-161, 2007.

Clary DO, Griff IC, Rothman JE. SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell.* 61: 709–721, 1990.

Cohen FS, Melikyan GB. The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J Membr Biol.* 199: 1-14, 2004.

Cohen LB, Salzberg BM. Optical measurement of membrane potential. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 83: 35–88, 1978.

Coleman WL, Bykhovskaia M. Synapsin I accelerates the kinetics of neurotransmitter release in mouse motor terminals. *Synapse.* 63: 531–533, 2009.

Cook JS. "Spark" vs. "Soup": A Scoop for Soup. *News in Physiological Sciences*. 1:206–208, 1986.

Conti F. Claude Bernard's *Des fonctions Du cerveau*: na ante litteram manifesto of the neurosciences? *Nat Ver Neurosci*. 979-986, 2002.

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247: 470–473, 1990.

Correia-de-Sá P, Sebastião AM, Ribeiro JA. Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve ending of the rat. *Br J Pharmacol*. 103: 1614-1620, 1991.

Cristovão-Ferreira S, Vaz S, Ribeiro JA, Sebastião AM. Adenosine A_{2A} receptors, through PKA activation, restrain PKC inhibition of GAT-1-mediated GABA uptake by nerve terminals. *J Neurochem*. 109: 336–347, 2009.

Crivellato E, Ribatti D. Soul, mind, brain: Greek philosophy and the birth of neuroscience. *Brain Res Bull*. 71: 327-336.

Cunha RA, Ribeiro JA. Adenosine A_{2a} receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the rat hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation. *Neurosci Lett*. 289: 127-130, 2000a.

Cunha RA, Ribeiro JA. Purinergic modulation of [³H] GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology*. 39: 1156-1167, 2000b.

Cunha RA, Johansson B, Fredholm BB, Ribeiro JA, Sebastião AM. Adenosine A_{2a} receptors stimulate acetylcholine release from nerve terminals of the rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 196: 41-44, 1995.

Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A₁ receptor activation to A_{2a} receptor blockade. *Purinergic Sign*. 1: 111-134, 2005.

Curtis DR, Watkins JC. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J Neurochem*. 6:117–141, 1960.

Dale HH, Feldberg W, Vogt M. Release of acetylcholine at voluntary nerve endings. *J Physiol*. 86: 353–380, 1936.

Dale HH. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J Pharm Exp Thep*. 6: 147-190, 1914.

Dale HH. The occurrence in ergot and action of acetylcholine. *J Physiol*. XLVIII, iii-iv, 1914b.

Dale HH. The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *J Physiol*. LXVII. 97-123, 1929.

Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev*. 74: 323-364, 1994.

Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci*. 14: 1143-1152, 2001.

de Camilli P, Cameron R, Greengard P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *J Cell Biol*. 96:1337-1354, 1983a.

de Camilli P, Harris SM Jr., Huttner WB, Greengard P. Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose embedded synaptosomes. *J Cell Biol*. 96:1355-1373, 1983b.

de Carlos JA, Borrel J. A historical reflection of the contributions of Cajal and Golgi to the foundations of neuroscience. *Brain Res Rev*. 55: 8-16, 2007.

de Duve C. The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nat Rev Genet* 8:395-403, 2007.

de Haro L, Ferracci G, Opi S, Iborra C, Quetglas S, Miquelis R, Leveque C, Seagar M. Ca^{2+} /calmodulin transfers the membraneproximal lipid-binding domain of the v-SNARE synaptobrevin from cis to trans bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 1578-1583, 2004.

de Jesus ML, Stope MB, OudeWeernink PA, Mahlke Y, Borgermann C, Ananaba VN, Rimbach C, Roskopf D, Michel MC, Jakobs KH & Schmidt M. Cyclic AMPdependent and Epac-mediated activation of R-Ras by G protein-coupled receptors leads to phospholipase D stimulation. *J Biol Chem* 281, 21837-21847, 2006.

de Robertis EDP, Bennett HS. Some features of the submicroscopic morphology of the synapses in frog and earthworm. *J Biophys Biochem Cytol*. 1: 47-55, 1955.

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide- exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396:474-477, 1998.

del Castillo J, Katz B. Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol*. 124: 560-573, 1954.

- Deák F, Schoch S, Liu X, Südhof TC, Kavalali ET. Synaptobrevin is essential for synaptic-vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol.* 6: 1102-1112, 2004.
- Deisseroth K. Optogenetics. *Nat Methods.* 8: 26-29, 2011.
- Denker A, Rizzoli SO. Synaptic vesicle pools: an update. *Front Syn Neurosci.* 2: 135-147, 2010.
- Descarries L, Beaudet A, Watkins KC. Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res.* 100: 563–588, 1975.
- DeWire SM, Seungkirl A, Lefkowitz RJ e Shenoy SK. B-arrestin and cell signaling. *Annu. Rv. Physiol.* 69: 483-510, 2007.
- Diógenes MJ, Fernandes CC, Sebastião AM, Ribeiro JA. Activation of adenosine A_{2a} receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 24: 2905-2913, 2004.
- Dixon WE. Vagus inhibition. *Brit Med J*, 22 december, 1907.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145, 1988.
- Dreosti E, Lagnado L. Optical reporters of synaptic activity in neural circuits. *Exp Physiol.* 6: 4-12, 2012.
- Duale H, Waki H, Howorth P, Kasparov S, Teschemacher AG, Paton JFR. Restraining influence of A2 neurons in chronic control of arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Res.* 76: 184-193, 2007.
- Duludova I, Sugita S, Hill S, Hosaka M, Fernandez I, Südhof TC, Rizo J. A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc 18. *EMBO J.* 18: 4372-4382, 1999.
- Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, Huryeva I, Südhof TC, Rizo J. Munc 18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 2697-26702, 2007.
- Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17: 7673-7682, 1997.
- Eadie MJ. A pathology of the animal spirits – the clinical neurology of Thomas Willis (1621-1675) Part II – Disorders of intrinsically abnormal animal spirits. *J Clin Neurosci.* 10:146-157, 2003.

Eakle KA, Bernstein M, Emr SD. Characterization of a component of the yeast secretion machinery: identification of the *SEC18* gene product. *Mol Cell Biol.* 8: 4098–4109, 1988.

Eccles JC. Synaptic transmission through a sympathetic ganglion. *J Physiol.* 81: 8P–9P, 1934.

Eccles JC. A review and restatement of the electrical hypothesis of synaptic excitatory and inhibitory action. *Arch Scient Physiol.* 3: 567–584, 1949.

Eccles JC, Fatt P, Koketsu K. Cholinergic and inhibitory synapses in a central nervous pathway. *Aust J Sci.* 16: 50–54, 1953.

Eccles JC, Fatt P, Koketsu K. Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. *J Physiol.* 126: 524–562, 1954a.

Eccles JC, Fatt P, Landgren S. The ‘direct’ inhibitory pathway in the spinal cord. *Aust J Sci.* 16: 130–134, 1954b.

Eccles JC, Eccles RM, Fatt P. Pharmacological investigations on a central synapse operated by acetylcholine. *J Physiol.* 131: 154–169, 1956.

Eccles JC. *The physiology of synapses.* Acad Press, New York. 1964.

Edwards RH. The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron.* 55: 835–858, 2007.

Elliott TR. On the action of adrenaline. *J Physiol.* XXXI: xx–xxi, 1904a.

Elliott TR. On the innervations of the ileo-colic sphincter. *J Physiol.* XXXI: 157–168, 1904b.

Elliott TR. The action of adrenaline. *J Physiol.* XXXII: 401–467, 1905.

Elliott MR, Cheken FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* 461:282–286, 2009.

Fasshauer D. Structure insights into the SNARE mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 1614: 87–97, 2003.

Fassio A, Merlo D, Mapelli J, Menegon A, Corradi A, Mete M, Zappettini S, Bonanno G, Valtorta F, D’Angelo E, Benfenati F. The synapsin domain E accelerates the exo-endocytotic cycle of synaptic vesicles in cerebellar Purkinje cells. *J Cell Sci.* 119: 4257–4268, 2006.

Fatt P, Katz B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. *J Physiol.* 115:320–370, 1951.

Fatt P, Katz B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 117:109–128, 1952.

Feldberg W, Gaddum JH. The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion. *Am J Physiol.* 81: 305–319, 1934.

Feldman RP, Goodrich JT. The Edwin Smith Surgical Papyrus. *Child's Nerv Syst.* 15:281-284, 1999.

Fernandes MJS. Alterações neuroquímica geradas no hipocampo de ratos durante a formação de um foco epiléptico induzido pela administração sistêmica de pilocarpina. Tese de Doutorado. Unifesp. SP, 1994.

Fernández-Chacón R, Königstorfer A, Gerber SH, García J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Südhof TC. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature.* 410: 41-50, 2001.

Fernández-Peruchena C, Navas S, Montes MA, Toledo GA. Fusion pore regulation of transmitter release. *Brain Res Rev.* 49: 406-415, 2005.

Ferré S, Ciruela F, Woods AS, Lluís C, Franco R. Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci.* 30: 440-447, 2007.

Ferreira A, Rapoport M. The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release. *Cell Mol Life Sci.* 59: 589 –595, 2002.

Ferreira ZS, Fernandes PACM, Duma D, Assreuy J, Avellar MCW, Markus RP. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res.* 30: 182-188, 2004.

Fesce R, Grohovaz F, Valtorta F, Meldolesi J. Neurotransmitter release: fusion or kiss-and-run? *Trends Cell Biol.* 4: 1–4, 1994.

Finger S. *Origins of neuroscience.* New York: Oxford University Press. 1994.

Fiumara F, Giovedi S, Menegon A, Milanese C, Merlo D, Montarolo PG, Valtorta F, Benfenati F, Ghirardi M. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase is essential for synapsin-induced enhancement of neurotransmitter release in invertebrate neurons. *J Cell Sci.* 117: 5145–5154, 2004.

Fleming KG, Hohl TM, Yu RC, Muller SA, Wolpensinger B, Engel A, Engelhardt H, Brunger AT, Sollner TH, Hanson PI. A revised model for the oligomeric state of the N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, NSF. *J Biol Chem.* 273: 15675–15681, 1998.

Florey E. Neurotransmitters and modulators in the animal kingdom. *Fed Proc.* 26: 1164–1178, 1967.

Fodstad H. The neuron Theory. *Stereotact Funct Neurosurg.* 77: 20-24, 2001.

Foster M, assisted by Sherrington CS. A text book of physiology, part III: The central nervous system, 7th ed. London: MacMillan & Co Ltd, 1897.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 53: 527-52, 2001.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Muller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors- An Update. *Pharmacol Rev.* 63: 1-34, 2011

Fresco P, Diniz C, Goncalves J. Facilitation of noradrenaline release by activation of adenosine A(2A) receptors triggers both phospholipase C and adenylate cyclase pathways in rat tail artery. *Cardiovasc Res.* 63: 739-46, 2004.

Fujimoto K, Shibasaki T, Yokoi N, Kashima Y, Matsumoto M, Sasaki T, Tajima N, Iwanaga T & Seino S. Piccolo, a Ca²⁺ sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis. *J Biol Chem.* 277: 50497–50502, 2002.

Fulton, JF. The physiology of the nervous system. Oxford University Press, 1938.

Furshpan EJ, Potter DD. Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol.* 145: 289-325, 1959.

Fuxe K, Hokfelt T, Jonsson G, Ungerstedt U. “Fluorescence microscopy in neuroanatomy”, in Contemporary research methods in neuroanatomy, ed W.J.H. Narura and S.O.E. Ebbesson (Berlin: Springer-Verlag). 275-314, 1970a.

Fuxe K, Hokfelt T, Ungerstedt U. Morphological and functional aspects of central monoamine neurons. *Int Rev Neurobiol.* 13: 93-126, 1970b.

Fuxe K, Dahlstro AB, Jonsson G, Marcellino D, Guescini M, Dam M, Manger P, Agnati L. The discovery of central monoamine neurons gave volume transmission to the wired brain. *Prog Neurobiol.* 90: 81-100, 2010.

Galvani L. De viribus electricitatis in motu musculari commentaris. *Bononien Sci Art Instit Acad Comm.* 7: 363–418, 1791.

Gao ZG, Jacobson KA. Emerging adenosine receptor agonists. *Expert Opin Emerg Drugs.* 12: 479-492, 2007.

Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S. NMDA receptor activation induced nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol.* 172: 413-413, 1989.

Garthwaite J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci.* 27: 2783-2802, 2008.

Geffen LB, Jessell TM, Cuellar AC, Iversen LL. Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature.* 260: 258-260, 1976.

Geppert M, Archer BT 3rd, Södhof TC. Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin. *J Biol Chem.* 266: 13548-13552, 1991.

Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Södhof TC. synaptotagmin I: A major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell.* 79: 717-727, 1994.

Gerachshenko T, Blackmer T, Yoon E, Bartleson C, Hamm HE, Alford S. $G\beta\gamma$ acts at the C terminus of SNAP-25 to mediate presynaptic inhibition. *Nat Neurosci.* 8: 597-606, 2005.

Gessi S, Cattabriga E, Avitabile A, Gafa' R, Lanza G, Cavazzini L, Bianchi N, Gambari R, Feo C, Liboni A, Gullini S, Leung E, Mac-Lennan S, Borea PA. Elevated expression of A3 adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells. *Clin Cancer Res.* 10: 5895-5901, 2004.

Gildenberg PL. Evolution of neuromodulation. *Stereotact Funct Neurosurg.* 83: 71-79, 2005.

Ginsborg BL, Hirst GD. Cyclic AMP, transmitter release and the effect of adenosine on neuromuscular transmission. *Nat New Biol.* 232: 63-64, 1971.

Ginsborg BL, Hirst GD. The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J Physiol.* 224: 629-645, 1972.

Giovedi S, Darchen F, Valtorta F, Greengard P, Benfenati F. Synapsin is a novel Rab3 effector protein on small synaptic vesicles. II. Functional effects of the Rab3A-synapsin I interaction. *J Biol Chem.* 279: 43769-43779, 2004a.

Giovedi S, Vaccaro P, Valtorta F, Darchen F, Greengard P, Cesareni G, Benfenati F. Synapsin is a novel Rab3 effector protein on small synaptic vesicles. I. Identification and characterization of the synapsin I-Rab3 interactions in vitro and in intact nerve terminals. *J Biol Chem.* 279:43760-43768 2004b.

Gomes CARV, Simões PF, Canas PM, Quiroz C, Sebastião AM, Ferré S, Cunha RA, Ribeiro JA. GDNF control of the glutamatergic cortico-striatal pathway requires tonic activation of adenosine A_{2a} Receptors. *J Neurochem.* 108: 1208-1219, 2009.

Goetz CG, Poewe W, Rascol O, Sampaio C. Evidence-based medical review update: pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease: 2001 to 2004. *Mov. Disord.* 20: 523–539, 2005.

Golgi C. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazzetta Medica Italiana. Lombardia.* 33: 244-246, 1873.

Gonzalo S, Linder ME. SNAP25 palmitoylation and plasma membrane targeting require a functional secretory pathway. *Mol Biol Cell.* 9: 585-597, 1998.

Gordon FJ, Sved AF. Neurotransmitters in central cardiovascular regulation: glutamate and GABA. *Clin Exp Pharm Physiol.* 29:522-524, 2002.

Greengard P, Kuo JF, Miyamoto E. Studies on the mechanism of action of cyclic AMP in nervous and other tissue. *Adv Enzyme Regul.* 9:113–125, 1970.

Greengard P, Kuo JF. On the mechanism of action of cAMP. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 3:287–306, 1970.

Greengard P, Browning MD, McGuinness TL, Llinas R. Synapsin I, a phosphoprotein associated with synaptic vesicles: possible role in regulation of neurotransmitter release. *Adv Exp Med Biol.* 221:135–53, 1987.

Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science.* 259: 780–785. 1993.

Guertzenstein PG. Vasodepressor and pressor responses to drugs topically applied to the ventral surface of the brainstem. *J Physiol.* 244: 84-85, 1972.

Hannan S, Wilkins ME, Dehghani-Tafti E, Thomas P, Baddeley SM, Smart TG. Gamma-aminobutyric acid type B (GABAB) receptor internalization is regulated by the R2 subunit. *J Biol Chem.* 286: 24324-24336, 2011.

Hanson PI, Whiteheart SW. AAA⁺ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6: 519–529, 2005.

Hata Y, Slaughter CA, Södhof TC. Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature.* 366: 347–351, 1993.

He L, Wu LG. The debate on the kiss-and-run fusion at synapses. *Trends Neurosci.* 30: 447-456, 2007.

Heese K, Fiebich BL, Bauer J, Otten U. Nerve growth factor (NGF) expression in rat microglia is induced by adenosine A2a-receptors. *Neurosci Lett.* 231: 83–86, 1997.

Henderson JM. Optogenetic neuromodulation. *Neurosurgery.* 64: 796-804, 2009.

Heuser JE, Reese TS. Structure of Synapse. Handbook of Physiology, The Nervous System, Cellular Biology of Neurons. Chapter 8: 261-295, 1977.

Hidaka, T., Osa, T., Twarog, B. M.. The action of 5-hydroxytryptamine on *Mytilus* smooth muscle. J Physiol London. 192:869-877, 1967.

Hilfiker S, Czernik AJ, Greengard P, Augustine GJ. Tonically active protein kinase A regulates neurotransmitter release at the squid giant synapse. J Physiol. 531: 141-146, 2001.

Hnasko TS, Edwards RH. Neurotransmitter corelease: Mechanism and physiological role. Annu Rev Physiol. 74: 225-243, 2012.

Hodgkin AL, Huxley AF. Action potentials recorded from inside a nerve fibre. Nature. 144: 710–711, 1939.

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. J Physiol 116: 424–448, 1952.

Hodgkin AL, Huxley AF. Propagation of electrical signals along giant nerve fibres. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 140: 177–183, 1952a.

Hodgkin AL, Huxley AF. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. J Physiol. 116, 449–472, 1952b.

Hodgkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. J Physiol. 116: 473–496, 1952c.

Hodgkin AL, Huxley AF. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. J Physiol. 116: 497–506, 1952d.

Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J Physiol. 117: 500–544, 1952e.

Holz GG. Epac: a new cAMP-binding protein in support of glucagonlike peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic B-cell. Diabetes, 53:5–13, 2004.

Holz GG, Kang G, Harbeck M, Roe MW, Chepurny OG. Cell physiology of cAMP sensor EPAC. J Physiol. 577: 5-15, 2006.

Hosaka M, Hammer RE, Södhof TC. A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. Neuron. 24: 377-387, 1999.

Hua Y, Scheller RH. Three SNARE complexes cooperate to mediate membrane fusion. Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 8065-8070, 2001.

Huang CC, Hsu KS. Presynaptic mechanism underlying cAMP induced synaptic potentiation in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *Mol Pharmacol* 69:846–856, 2006.

Hunt R, Taveau RM. On the physiological action of certain cholin derivatives and new methods for detecting cholin. *Brit Med J II*. 1788-1791, 1906.

Hvalby O, Jensen V, Kao HT, Walaas SI. Synapsin-regulated synaptic transmission from readily releasable synaptic vesicles in excitatory hippocampal synapses in mice. *J Physiol*. 571: 75–82, 2006.

Jahn R, Scheller RH. SNAREs-engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7: 631-643, 2006.

Jarvis SE, Zamponi GW. Master or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels. *Cell Calcium*. 37: 483-488, 2005.

Jin S, Fredholm BB. Adenosine A_{2a} receptor stimulation increases release of acetylcholine from rat hippocampus but not striatum, and does not affect catecholamine release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 355: 48– 56, 1997.

Jo YH, Role RW. Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J Neurosci*. 22: 4794-4804, 2002.

Johannes LB. EPAC proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends in Biochem Sci* 31: 680-686, 2006.

Johnson EM, Ueda T, Maeno H, Greengard P. Adenosine 3',5- monophosphate-dependent phosphorylation of a specific protein in synaptic membrane fractions from rat cerebrum. *J Biol Chem*. 247: 5650–5652, 1972.

Johnson MD. Synaptic glutamate release by postnatal rat serotonergic neurons in microculture. *Neuron*. 12: 433–42, 1994.

Jovanovic JN, Benfenati F, Siow YL, Sihra TS, Sanghera JS, Pelech SL, Greengard P, Czernik AJ. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 3679-3683, 1996.

Kaczmarek LK, Jennings KR, Strumwasser F, Nairn AC, Walter U, Wilson FD, Greengard P. Microinjection of catalytic subunit of cyclic amp-dependent protein kinase enhances calcium action potentials of bag cell neurons in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77: 7487–7491, 1980.

Kaeser PS, Deng L, Chávez AE, Liu X, Castillo PE, Södholf TC. ELKS2 α /CAST deletion selectively increases neurotransmitter release at inhibitory synapses. *Neuron*. 64: 227-239, 2009.

Kaneko M, Takahashi T. Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation. *J Neurosci.* 24: 5202-5208, 2004.

Kang G, Joseph JW, Chepurny OG, Monaco M, Wheeler MB, Bos JL, Schwede F, Genieser HG, Holz GG. Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 27: 8279-8285, 2003.

Kashima Y, Miki T, Shibasaki T, Ozaki N, Miyazaki M, Yano H, Seino S. Critical role of cAMP-GEFII-Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J Biol Chem.* 276: 46046-46053, 2001.

Katz B, Miledi R. The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 161: 496-503, 1965.

Katz B, Miledi R. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol.* 1951: 481-492, 1968.

Katz P. *Beyond Neurotransmission: Neuromodulation and Its Importance for Information Processing.* New York: Oxford Univ. Press. 1999.

Kawahara K, Kosugi T, Tanaka M, Nakajima T, Yamada T. Reverse operation of glutamate transporter GLT-1 is crucial to the development of preconditioning-induced ischemic tolerance of neurons in neuron/astrocyte co-cultures. *Glia.* 49: 349-359, 2005.

Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282: 2275-2279, 1998.

Kirk IP, Richardson PJ. Adenosine A_{2a} receptor-mediated modulation of striatal [^3H]GABA and [^3H]acetylcholine release. *J Neurochem.* 62: 960-966, 1994.

Kivell BM, McDonald FJ, Miller JH. Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. *Brain Res Brain Res Protoc.* 6: 91-99, 2001.

Kölliker A. *Handbuch der Gewebelehre des Menschen für Aertze und Studirende.* Leipzig. 1862.

Krnjevic K. When and why amino acids? *J Physiol.* 588: 33-44, 2010.

Kruger L, Otis TS. Whither withered Golgi? A retrospective evaluation of reticularist and synaptic construction. *Brain Res Bull.* 72: 201-207, 2007.

Kuo JF, Greengard P. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. VI. Isolation and partial purification of a protein kinase activated by guanosine 3',5'-monophosphate. *J Biol Chem.* 245:2493-2498, 1970.

Kupfermann I. Modulatory actions of neurotransmitters. *Ann Rev Neuroci.* 2: 447-465, 1979.

Langley JN. Observations on the physiological action of extracts of the supra-renal bodies. *J Physiol.* XXVII: 237-256, 1901.

Langley JN. On nerve endings and on special excitable substances in cells. *Proc Roy Soc Lond.* BLXXVIII: 170-194, 1906.

Langley JN. On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substance. Part 1. *J Physiol.* XXXVI: 347-384, 1907.

Langley JN. On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substance. Part III. The reaction of frogs muscle to nicotine after denevation *J Physiol.* XXXVII: 285-300, 1908.

Langley JN. On the reaction of cells and of nerve ending to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and curari. *J Physiol.* XXVIII: 374-403, 1905.

Latini S, Bordoni F, Pedata F, Corradetti R. Extracellular adenosine concentrations during *in vitro* ischaemia in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol.* 127: 729-739, 1999.

Lebmann V, Heumann R. Cyclic AMP endogenously enhances synaptic strength of developing glutamatergic synapses in serum-free microcultures of rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 763: 111-122, 1997.

Lee S, Kim K, Zhou ZJ. Role of ACh-GABA cotransmission in detecting image motion and motion direction. *Neuron.* 68:1159-72, 2010.

Leenders AGM, Sheng Z. Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases: Implications for presynaptic plasticity. *Pharm Therap.* 105: 69-84, 2005.

Lewit PA, Guttman M, Tetrud JW, Tuite PJ, Mori A, Chaikin P, Sussman NM. 6002-US-005 Study Group. Adenosine A_{2a} receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces "off" time in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, multicenter clinical trial (6002-US-005) *Ann Neurol.* 63: 2950392, 2008.

Li F, Pincet F, Perez E, Eng WS, Melia TJ, Rothman JE, Tareste D. Energetics and dynamics of SNAREpin folding across lipid bilayers. *Nat Struc Mol Biol.* 14: 890-897, 2007.

Lin LH, Edwards RH, Freneau RT, Fujiyama F, Kaneko T, Talman WT. Localization of vesicular glutamate transporters and neuronal nitric oxide synthase in rat nucleus tractus solitarii. *Neuroscience.* 123: 247-255, 2004.

Linden J. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Mol Pharmacol*. 67:1385-1387, 2005.

Link E, Edelmann L, Chou JH, Binz T, Yamasaki S, Eisel U, Baumert M, Södhof TC, Niemann H, Jahn R. Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 189: 1017–1023, 1992.

Loewi O, Navratil E. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. X. Über das Schicksal des Vagusstoffs. *Pflugers Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*. 214: 678–688, 1926a.

Loewi O, Navratil E. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. XI. Über den Mechanismus der Vaguswirkung von Physostigmin und Ergotamin. *Pflugers Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*. 214: 689–696, 1926b.

Loewi O. *From the Workshop of discoveries*. Uni Kansas Press Lawrence. 1953.

Loewi O. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I. *Pflugers Archiv für die Gesamte Physiologie Menschen und der Tiere*. 189: 239–242, 1921.

Lonart G, Schoch S, Kaeser PS, Larkin CJ, Södhof TC, Linden DJ. Phosphorylation of RIM1 α by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses. *Cell*. 115: 49-60, 2003.

Lopes LV, Cunha RA, Kull B, Fredholm BB, Ribeiro JA. Adenosine A_{2a} receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A₁ receptor inhibition. *Neuroscience*. 112: 319-329, 2002.

López-Muñoz F, Boya J, Alamo C. Neuron theory, the cornerstone of neuroscience, on the centenary of the Nobel Prize award to Santiago Ramón y Cajal. *Brain Res Bull*. 70: 391-405, 2006.

Maehle AH. A binding question: the evolution of the receptor concept. *Endeavour*. 33: 135-140, 2009.

Magby JP, Bi C, Chen ZY, Lee FS, Plummer MR. Single-cell characterization of retrograde signaling by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 26: 13531–13536, 2006.

Maienschein V, Marxen M, Volknandt W, Zimmermann H. A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia*. 26: 233–244, 1999.

March M, Raiteri L, Risso F, Vallarino A, Bonfanti A, Monopoli A, Ongini E, Raiteri M. Effects of adenosine A₁ and A_{2a} receptor activation on the evoked release of glutamate from rat cerebrocortical synaptosomes. *Br J Pharma*. 16: 434-440, 2002.

Marchi M, Grilli M. Presynaptic nicotinic receptors modulating neurotransmitter release in the Central Nervous System: Functional interactions with other coexisting receptors. *Prog Neurobiol.* 92: 105-111, 2010.

Martens S, Kozlov MM, MacMahon HT. How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science.* 316: 1205-1210, 2007.

Martinez-Arca S, Rudge R, Vacca M, Raposo G, Camonis J, Proux-Gillardeaux V, Daviet L, Formstecher E, Hamburger A, Filippini F, D'Esposito M, Galli T. A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 100: 9011-9016, 2003.

Mashimo M, Okubo Y, Yamazawa T, Yamasaki M, Watanabe M, Murayama T e Iino M. Inositol 1,4,5-trisphosphate signaling maintains the activity of glutamate uptake in Bergmann glia. *Eur J Neurosci.* 32: 1668-1677, 2010.

Matveeva E, Whiteheart SW. The effects of SNAP/SNARE complexes on the ATPase of NSF. *FEBS Lett.* 435: 211-214, 1998.

Maximov A, Tang J, Yang X, Pang ZP, Södhof TC. Complexin controls the force transfer from SNARE complexes to membranes in fusion. *Science.* 323: 516-521, 2009.

Mayfield RD, Suzuki F, Zahniser NR. Adenosine A_{2a} modulation of electrically-evoked endogenous GABA release from slices of rat globus pallidus. *J Neurochem.* 60: 2334-2337, 1993.

Mayford M, Siegelbaum SA, Kandel ER. Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4: a005751-a005770, 2012.

Mayne M, Fotheringham J, Yan HJ, Power C, Del Bigio MR, Peeling J, Geiger JD. Adenosine A_{2a} receptor activation reduces proinflammatory events and decreases cell death following intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol.* 49: 727-735, 2001.

Medine CN, Rickman C, Chamberlain LH, Duncan RR. Munc18-1 prevents the formation of ectopic SNARE complexes in living cells. *J Cell Sci.* 120: 4407-4415, 2007.

Menegon A, Bonanomi D, Albertinazzi C, Lotti F, Ferrari G, Kao HT, Benfenati F, Baldelli P, Valtorta F. Protein kinase A-mediated synapsin I phosphorylation is a central modulator of Ca²⁺-dependent synaptic activity. *J Neurosci.* 45: 11670-11681, 2006.

Mierlak D, Farb DH. Modulation of neurotransmitter receptor desensitization: Chlordiazepoxide stimulates fading of the GABA receptors. *J Neurosci.* 8: 814-820, 1988.

- Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*. 6689: 192-195, 1998.
- Miesenböck G, Kevrekidis IG. Optical imaging and control of genetically designated neurons in functioning circuits. *Annu Rev Neurosci*. 28: 533–563, 2005.
- Miesenböck G. The optogenetic catechism. *Science*. 5951: 395-399, 2009.
- Miller RJ. Presynaptic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 38: 201–227, 1998.
- Mittelstaedt, T., Alvarez-Baron, E., Schoch, S. RIM proteins and their role in synapse function. *Biol Chem*. 391: 599-606, 2010.
- Miura M, Reis DJ. The role of the solitary and paramedian reticular nuclei in mediating cardiovascular reflex response from carotid baro- and chemoreceptors. *J Physiol*. 223: 525-548, 1992.
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, Mccaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. 6645: 882-887, 1997.
- Miyawaki A. Innovations in the imaging of brain functions using fluorescent proteins. *Neuron*. 48: 189–199, 2005.
- Mojsilovic-Petrovic J, Jeong GB, Crocker A, Arneja A, David S, Russel DS, Kalb RG. Protecting motor neurons from toxic insult by antagonism of adenosine A_{2a} and TrkB receptors. *J Neurosci*. 26: 9250-9263, 2006.
- Morgan A, Dimaline R, Burgoyne RD, The ATPase activity of N-ethylmaleimidesensitive fusion protein (NSF) is regulated by soluble NSF attachment proteins. *J Biol Chem*. 269: 29347–29350, 1994.
- Moruzzi G. The electrophysiological work of Carlo Matteucci. *Brain Res Bull*. 2: 69-91, 1996.
- Moulder KL, Jiang X, Taylor AA, Shin W, Gillis KD, Mennerick S. Vesicle pool heterogeneity at hippocampal glutamate and GABA synapses. *J Neurosci*. 37: 9846-9854, 2007.
- Muller CE. A_1 adenosine receptors and their ligands: overview and recent developments. *Pharmacol*. 2: 77-80, 2001.
- Murray AJ. Pharmacological PKA inhibition: All may not be what it seems. *Sci Signal*. 1: 1-5, 2008.

Muscholl E. The evolution of experimental pharmacology as a biological science: the pionnering work of Buchhein and Schmiedeberg. *Br J Pharmacol.* 116: 2155-2159, 1995.

Nagy G, Reim K, Matti U, Brose N, Binz T, Rettig J, Neher E, e Sorensen JB. Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron.* 41: 417-429, 2004.

Nieler HB, Onofri F, Schaeffer E, Menegon A, Fesce R, Valtorta F, Greengard P, Benfenati F. Phosphorylation-dependent effects of synapsin IIa on actin polymerization and network formation. *Eur J Neurosci.* 12: 2712-2722, 1997.

Novick P, Field C, Schekman R. Identification of 23 complementation groups required for posttranslational events in the yeast secretory pathway. *Cell.* 21: 205-215, 1980.

Ochi M, Koga K, Kurokawa H, Kase J, Nakamura J, Kuwana Y. Systemic administration of adenosine A_{2a} receptor antagonist reverses increased GABA release in the Globus pallidus of unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats: a microdialysis study. *Neuroscience.* 100: 53-62, 2000.

Okada M, Nutt DJ, Murakami T, Zhu G, Kamata A, Kawata Y, Kaneko S. Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J Neurosci.* 21: 628- 640, 2001.

Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE, Wilson MC. The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol.* 109: 3039-3052, 1989.

Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y, e Seino S. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol.* 2: 805-811, 2000.

Pacak K, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS. Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitaryadrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdilysis studies. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 16: 89-150, 1995.

Palade GE, Palay SL. Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anat Rec.*118: 335-336, 1954.

Palkovits M. Distribution of neuroactive substances in the dorsal vagal complex of the medulla oblongata. *Neurochem Int.* 7: 213-219, 1985.

Palmer TM, Stiles GL. Adenosine receptors. *Neuropharmac.* 34: 683-694, 1995.

Pang ZP, Södhof TC. Cell biology of Ca^{2+} -triggered exocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* 22: 496–505, 2010.

Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science.* 310: 113-116, 2005.

Peirce SM, Skalak TC, Rieger JM, Macdonald TL, Linden J. Selective $\text{A}_{2\text{A}}$ adenosine receptor activation reduces skin pressure ulcer formation and inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281: H67-74, 2001.

Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32: 421-432, 2009.

Perin MS, Brose N, Jahn R, Södhof TC. Domain structure of synaptotagmin (p65). *J Biol Chem.* 266: 623–629, 1991.

Perin MS, Fried VA, Mignery GA, Jahn R, Södhof TC. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature.* 345:260–263, 1990.

Phillis JW, Walter GA, O'Regan MH, Stair RE. Increases in cerebral cortical perfusate adenosine and inosine concentration during hypoxia and ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 7: 679–686, 1987.

Piccolino M. Luigi Galvani and animal electricity: two centuries after the foundation of electrophysiology. *Trends Neurosci.* 20: 433-488, 1997.

Pinto-Duarte A, Coelho JE, Cunha RA, Ribeiro JA, Sebastião AM. Adenosine $\text{A}_{2\text{a}}$ receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus. *J Neurochem.* 93: 595–604, 2005.

Pobhati AV, Stein A, Fasshauer D. N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion. *Science.* 313: 673–676, 2006.

Popoli P, Betto P, Reggio R, Ricciarello G. Adenosine $\text{A}_{2\text{a}}$ receptor stimulation enhances striatal extracellular glutamate levels in rats. *Eur J Pharm.* 287: 215-217, 1995.

Popoli P, Blum D, Martire A, Ledent C, Ceruti S, Abbracchio MP. Functions, dysfunctions and possible therapeutic relevance of adenosine $\text{A}_{2\text{a}}$ receptors in Huntington's disease. *Prog Neurobiol.* 81:331–348, 2007.

Prybylowski K, Chang K, Sans N, Kan L, Vicini S, Wenthold RJ. The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron.* 47: 845–857, 2005.

Quarta D, Ferré S, Solinas M, You ZB, Hockemeyer J, Popoli P, Goldberg SR. Opposite modulatory roles for adenosine A₁ and A_{2a} receptors on glutamate and dopamine release in the Shell of the nucleus accumbens. Effects of chronic caffeine exposure. *J Neurochem.* 88: 1151-1158, 2004.

Quirke V. Putting theory into practice: James Black, receptor theory and the development of beta-blockers at ICI, 1958-1978. *Med Hist.* 50: 69-92, 2006.

Raingo J, Khvotchev M, Liu P, Darios F, Li YC, Ramirez DMO, Adachi M, Lemieux P, Davletov B, Kavalali ET. VAMP4 directs synaptic vesicles to a pool that selectively maintains asynchronous neurotransmission. *Nat Neurosci.* 15: 738-747, 2012.

Rebola N, Oliveira CR, Cunha RA. Transduction system operated by adenosine A_{2a} receptor to facilitate acetylcholine release in the rat hippocampus. *Eur J Pharm.* 454: 31-38, 2002.

Regehr WG, Carey MR, Best AR. Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers. *Neuron.* 63: 154-73, 2009.

Rey R. History of pain. Editions La Decouverte, Paris, 1993.

Ribeiro JA, Sebastião AM. Modulation and metamodulation of synapses by adenosine. *Acta Physiol.* 199: 161-169, 2010.

Rickman C, Jiménez JL, Graham ME, Archer DA, Soloviev M, Burgoyne RD, Davletov B. Conserved prefusion protein assembly in regulated exocytosis. *Mol Biol Cell.* 17: 283-294, 2006.

Rivkees SA, Zhao Z, Porter G, Turner C. Influences of adenosine on the fetus and newborn. *Mol Gen Metab.* 74: 160-171, 2001.

Rizzoli SO, Betz WJ. Synaptic vesicles pools. *Nat Rev Neurosci.* 6: 57-70, 2005.

Roberts E, Frankel S. Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem.* 187:55-63, 1950.

Scislo TJ, O'Leary DS. Vasopressin V1 receptor contribute to hemodynamic and sympathoinhibitory responses evoked by stimulation of adenosine A_{2a} receptors in NTS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290: H1889-H1898, 2006.

Sebastião AM, Ribeiro JA. Evidence for the presence of excitatory A_{2a} adenosine receptors in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 138: 41-44, 1992.

Sebastião AM, Ribeiro JA. Adenosine A₂ receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol.* 48: 167-89, 1996.

Sebastião AM, Macedo MP, Ribeiro JA. Tonic activation of A(2A) adenosine receptors unmasks, and of A(1) receptors prevents, a facilitatory action of

calcitonin gene-related peptide in the rat hippocampus. *Br J Pharmacol.* 129: 374–380, 2000.

Sebastião AM, Ribeiro JA. Tuning and fine-tuning of synapses with adenosine. *Curr Neuropharm.* 7: 180-194, 2009.

Sedej S, Rose T, Rupnik M. cAMP increases Ca^{2+} -dependent exocytosis through both PKA and Epac2 in mouse melanotrophs from pituitary tissue slices. *J Physiol.* 567: 799–813, 2005.

Sekizawa S, Bonham AC. Group I metabotropic glutamate receptors on second-order baroreceptor neurons are tonically activated and induce a Na^{+} - Ca^{2+} exchange current. *J Neurophysiol.* 95: 882–892, 2006.

Shepherd GM, Erulkar SD. Centenary of the synapse: from Sherrington to the molecular biology of the synapse and beyond. *Trends Neurosci.* 20: 385-392, 1997.

Sherrington CS. The integrative action of the nervous system. Yale Univ Press, New Harven. 1906.

Sherrington CS. The endeavour of Jean Fernel. Cambridge University Press, Cambridge, 1946.

Shibasaki T, Sunaga Y, Fujimoto K, Kashima Y, e Seino S. Interaction of ATP sensor, cAMP sensor, Ca^{2+} sensor, and voltage-dependent Ca^{2+} channel in insulin granule exocytosis. *J Biol Chem.* 279: 7956–7961, 2004.

Shryock JC, Snowdy S, Baraldi PG, Cacciari B, Spalluto G, Monopoli A, Ongini E, Baker SP, Belardinelli L. A_{2a} -adenosine receptor reserve for coronary vasodilation. *Circulation.* 98: 711-718, 1998.

Siegel MS, Isacoff EY. A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *Neuron.* 19: 735-741, 1997.

Siegelbaum SA, Camardo JS e Kandel ER. Serotonin and cyclic AMP close single K^{+} channels in *Aplysia* sensory neurons. *Nature* 299:413– 417, 1982.

Sims NR, Zaidan E. Biochemical changes associated with selective neuronal death following short-term cerebral ischaemia. *Int J Biochem Cell Biol.* 27: 531-550, 1995.

Sjulson L, Miesenböck G. Optical recording of action potentials and other discrete physiological events: A perspective from signal detection theory. *Physiology.* 22: 47-55, 2007.

Södhof TC, Baumert M, Perin MS, Jahn R. A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to drosophila. *Neuron.* 2: 1475–1481, 1989.

Södhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. *Science*. 323: 474-478, 2009.

Södhof TC. The presynaptic active zone. *Neuron*. 75: 11-26, 2012.

Södhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*. 27:509–547, 2004.

Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 75: 409–418, 1993a.

Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. 362: 318–324, 1993b.

Sotelo C. Camillo Golgi and Santiago Ramón y Cajal: The anatomical organization of the cortex of the cerebellum. Can the neuron doctrine still support our actual knowledge on cerebellar structural arrangement? *Brain Res Rev*. 66: 16-34, 2010.

Sperlágh B, Heinrich A, Csölle C. P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic Sig*. 3: 269-284, 2007.

Sperlágh B, Vizi ES. Extracellular Interconversion of nucleotides reveals an ecto-adenylate kinase activity in the rat hippocampus. *Neurochem. Res*. 32: 1978-1989, 2007.

Stefani G, Onofri F, Valtorta F, Vaccaro P, Greengard P, Benfenati F. Kinetic analysis of the phosphorylation-dependent interactions of synapsin I with rat brain synaptic vesicles. *J Physiol*. 504: 501-515, 1997.

St Lambert JH, Dashwood MR, Spyer KM. Role of brainstem adenosine A₁ receptors in the cardiovascular response to hypothalamic defence area stimulation in the anaesthetised rat. *Br J Pharmac*. 117: 277–282, 1996.

St Lambert JH, Thomas T, Burnstock G, Spyer KM. A source of adenosine involved in cardiovascular responses to defense area stimulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 272: R195–R200, 1997.

Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10: 513-25, 2009.

Stephens GJ. G-protein-coupled-receptor-mediated presynaptic inhibition in the cerebellum. *Trends Pharmacol Sci*. 30: 421–430, 2009.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. 395: 347-353, 1998.

Sved AF, Gordon FJ. Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. *Articles and Review – News in Physiological Sciences*. 9: 243-46, 1994.

Sved AF, Ito S, Yajima S. Role of excitatory amino acid inputs to the rostral ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 29: 503-506, 2002.

Swanson LW. Quest for the basic plan of nervous system circuitry. *Brain Res Rev*. 356-372, 2007.

Szobota S, Gorostiza P, Del Bene F, Wyart C, Fortin DL, Kolstad KD, Tulyathan O, Volgraf M, Numano R, Aaron HL, Scott EK, Kramer RH, Flannery J, Baier H, Trauner D, Isacoff EY. Remote control of neuronal activity with a light-gated glutamate receptor. *Neuron*. 54: 535-545, 2007.

Tabares L, Ruiz R, Linares-Clemente P, Gaffield MA, Alvarez de Toledo G, Fernandez-Chacon R, Betz WJ. Monitoring synaptic function at the neuromuscular junction of a mouse expressing synaptobluorin. *J Neurosci*. 27: 5422-5430, 2007.

Tagaya M, Wilson DW, Brunner M, Arango N, Rothman JE. Domain structure of an N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein involved in vesicular transport. *J Biol Chem*. 268: 2662–2666, 1993.

Takamine J. The isolation of the active principle of suprarenal gland. *J Physiol Lond*. 27: xxix-xxx, 1901.

Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller, Heuser J, Wieland F, Jahn R. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*. 127: 831–46, 2006.

Talman WT, Granata AR, Reis DS. Glutamatergic mechanisms in the nucleus tractus solitarius in blood pressure control. *Fed Proc*. 43: 39-44, 1984.

Talman WT, Perrone MH, Reis DJ. Evidence for L -glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. *Science*. 209: 813–815, 1980.

Tang J, Maximov A, Ok-Ho S, Dai H, Rizo J, Södhof TC. A complexin/syntaxin1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell*. 126: 1175-1187, 2006.

Tansey EM. Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *C R Bio*. 329: 419-425, 2006.

Tansey EM. Not committing barbarisms: Sherrington and the synapse, 1897. *Brain Res Bull*. 44: 211-212, 1997.

Taraska JW, Zagotta WN. Fluorescence applications in molecular neurobiology. *Neuron*. 66: 170-180, 2010.

Tasken K e Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*. 84: 137–167, 2004.

Taylor SS, Yang J, Wu J, Haste NM, Radzio-Andzelm E, Anand G. PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 1697: 259–269, 2004.

Theodosis DT, Poulain DA, Olier SH. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interaction. *Physiol Rev*. 88: 983-1008, 2008.

Thomas T, St Lambert JH, Dashwood MR, Spyer KM. Localization and action of adenosine A2a receptor in regions of the brainstem important in cardiovascular control. *Neurosci*. 95: 513-518, 2000.

Thorn JA, Jarvis SM. Adenosine transporters. *Gen Pharmacol*. 27: 613-620, 1996.

Todman D. Synapse. *Eur Neurol*. 61: 190-191, 2008.

Trimble WS, Cowan DM, Scheller RH. VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85: 4538–4542, 1988.

Trudeau LE, Emery DG, Haydon PG. Direct modulation of the secretory machinery underlies PKA-dependent synaptic facilitation in hippocampal neurons. *Neuron*. 4: 789-797, 1996.

Trudeau LE, Fang Y, Haydon PG. Modulation of an early step in the secretory machinery in hippocampal nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12: 7163-7168, 1998.

Tsai PS. Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: Structure, function, and evolution. *Gen Comp Endroc*. 148:48-53, 2006.

Tseng CJ, Biaggioni I, Appalsamy M, Robertson D. Purinergic receptors in the brainstem mediate hypotension and bradycardia. *Hypertension*. 11: 191–197, 1988.

Ueda T, Maeno H, Greengard P. Regulation of endogenous phosphorylation of specific proteins in synaptic membrane fractions from rat brain by adenosine 3':5'-monophosphate. *J Biol Chem*. 248: 8295–8305, 1973.

Ueno H, Shibasaki T, Iwanaga T, Takahashi K, Yokoyama Y, Liu LM, Yokoi N, Ozaki N, Matsukura S, Yano H, e Seino S. Characterization of the gene EPAC2: structure, chromosomal localization, tissue expression, and identification of the liver-specific isoform. *Genomics*. 78: 91–98, 2001.

Ungerstedt U, Butcher LL, Butcher SG, Anden NE, Fuxe K. Direct chemical stimulation of dopaminergic mechanisms in the neostriatum of the rat. *Brain Res.* 14: 461–471, 1969.

Valenstein ES. The discovery of chemical neurotransmitters. *Brain Cong.* 49: 73-95, 2002.

Valtorta F, Greengard P, Fesce R, Chieriegatti E, Benfenati F. Effects of the neuronal phosphoprotein synapsin I on actin polymerization. I. Evidence for a phosphorylation-dependent nucleating effect. *J Biol Chem.* 267: 11281–11288, 1992.

van Giersbergen PL, Palkovits M, De Jong W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. *Physiol Rev.* 72: 789-824, 1992.

Venance L, Stella N, Glowinski J, Giaume C. Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *J Neurosci.* 17: 1981–1992, 1997.

Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Södhof TS. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science.* 287: 864–869, 2000.

Vesalius A. *De humani corporis fabrica libri septem.* J Oporinus, Basel. 1553.

Vesalius A. *De humani corporis fabrica libri septem.* J Oporinus, Basel, 1955.

Vizi ES. *Non-synaptic Interactions between neurons: Modulation of Neurochemical Transmission. Pharmacological and Clinical Aspects.* John Wiley and Sons, Chichester, New York, 1984.

von Euler US. A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (sympathin) and its relations to adrenaline and nor-adrenaline. *Acta Physiol Scand* 12:73–97, 1946.

Vulpian EF. *Lecons sur la physiologie generale et comparee du systeme nerveux.* Bailliere, Paris, 1866.

Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. An adenosine 3',5'- monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Bio Chem.* 243: 3763-3765, 1968.

Watkins JC, Jane DE. The glutamate story. *Br J Pharmacol.* 147: S100-A108, 2006.

Wei CJ, Wei L, Chem JF. Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. *Biochimica Biophysica Acta.* 1808: 1358-1379, 2011.

Weisskopf MG, Castillo PE, Zalutsky RA, e Nicoll RA. Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science*. 265: 1878–1882, 1994.

Weisskopf MG, Zalutsky RA, Nicoll RA. The opioid peptide dynorphin mediates heterosynaptic depression of hippocampal mossy fibre synapses and modulates long-term potentiation. *Nature*. 362: 423–427, 1993.

Weninger KR. Complexin arrests a neighbor. *Nat Struc Mol Biol*. 18: 861-864, 2011.

Wickstead B, Gull K. The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol*. 4:513-525, 2011.

Willis T. *Cerebri anatome: cui accessit nervorum descriptio et usus*. Flescher, Martyn and Allstry, London, 1664.. English translation by S. Pordage. 1681. *The Remaining Medical Works of that Famous and Renowned Physician Dr. Thomas Willis*. Dring, Harper, Leigh, and Martyn, London.

Wilson DW, Wilcox CA, Flynn GC, Chen E, Kuang WJ, Henzel WJ, Block MR, Ullrich A, Rothmann JE. A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. *Nature*. 339: 355–359, 1989.

Xue M, Reim K, Chen X, Chao H, Deng H, Rizo J, Brose N, Rosemund C. Distinct domeins of complexin I differentially regulate neurotransmitter release. *Nat Struc Mol Biol*. 14: 949-959, 2007.

Yaar R, Jones MR, Chen JF, Ravid K. Animal models for the study of adenosine receptor function. *J Cell Physiol*. 202: 9–20, 2005.

Yao J, Gaffaney JD, Kwon SE, Chapman DR. Doc2 is a Ca²⁺ sensor required for asynchronous neurotransmitter release. *Cell*. 147: 666-677, 2011.

Yarwood SJ. Microtubule-associated proteins (MAPs) regulate cAMP signalling through exchange protein directly activated by cAMP (EPAC). *Biochem Soc Trans*. 33: 1327–1329, 2005.

Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. *BBA*. 1783: 673-694, 2008.

Young SM, Jr, Neher E. Synaptotagmin has an essential function in synaptic vesicle positioning for synchronous release in addition to its role as a calcium sensor. *Neuron*. 63: 482–496, 2009.

Zetterstrom T, Vernet L, Ungerstedt U, Tossman U, Jonzon B, Fredholm BB. Purine levels in the Intact rat brain. Studies with an implanted perfused hollow fibre. *Neurosci Lett*. 29: 111-115, 1982.

Zhang F, Wang LP, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, Wood PG, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A, Deisseroth K. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*. 446:633–639, 2007.

Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 906–918, 2002.

Zhang W, Mifflin S. Plasticity of GABAergic mechanisms within the nucleus of the solitary tract in hypertension. *Hypertension.* 55: 201-206, 2010.

Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol.* 9:945–953, 2007.

Zhao C, Smith EC, Whiteheart SW. Requirements for the catalytic cycle of the N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF). *Bio Biophys Acta.* 1823: 159-171, 2012.

Zhong N, Zucker RS. cAMP acts on exchange protein activated by cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange protein to regulate transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *J Neurosci.* 25: 208-214, 2005.

Zhong Y, Wu CF. Altered synaptic plasticity in *Drosophila* memory mutants with a defective cyclic AMP cascade. *Science.* 251: 198-201, 1991.

Zhou Z, Champagnat J, Poon C. Phasic and long- term depression in brainstem nucleus tractus solitarius neurons: differing roles of AMPA receptor desensitization. *J neurosci.* 17: 5349-5356, 1997.

Zieglgänsberger W, Bayer H. The mechanism of inhibition of neuronal activity by opiates in the spinal cord of cat. *Brain Res.* 115: 111-128, 1976.

Zilberter Y, Harkany T, Holmgren CD. Dendritic release of retrograde messengers controls synaptic transmission in local neocortical networks. *Neuroscientist.* 11: 334–344, 2005.

Zilberter Y, Kaiser KM, Sakmann B. Dendritic GABA release depresses excitatory transmission between layer 2/3 pyramidal and bitufted neurons in rat neocortex. *Neuron.* 24: 979–988, 1999.