

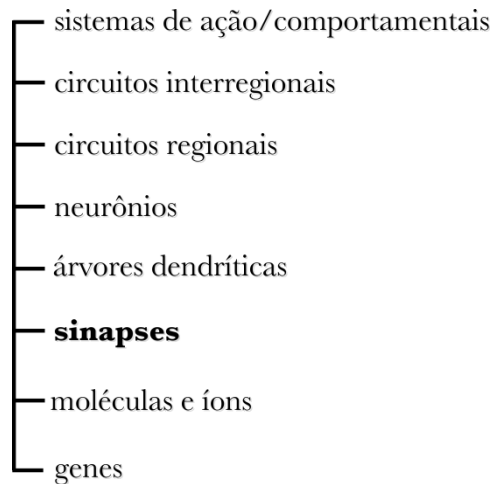
Fisiologia e Plasticidade Sináptica -  
Um pouco de tudo.

Prof. Ricardo M. Leão – FMRP/USP

## Uma visão geral da neurotransmissão.

### 1. As sinapses e os seus dois lados.

Os neurônios são as unidades processadoras básicas do sistema nervoso, as células responsáveis pela transdução dos estímulos físicos em sinais elétricos, por sua transmissão e processamento e finalmente para o envio dos sinais que gerarão as respostas do organismo aos estímulos externos e internos. A unidade funcional básica dos neurônios é a sinapse. Dentre os diferentes níveis de organização dos sistemas orgânicos, e no caso em particular do sistema nervoso (figura 1), a **sinapse** é o elo entre as moléculas e a célula. Ela processa sinais químicos e os transforma em sinais de significado fisiológico para o neurônio.

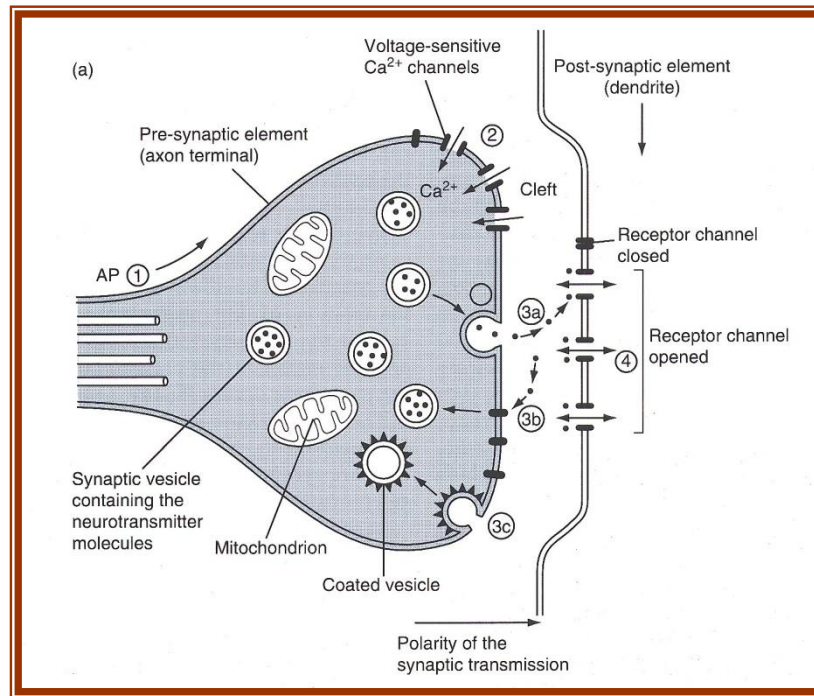


**Figura 1:** hierarquia organizacional do sistema nervoso.

A sinapse é um posto de comunicação entre dois neurônios ou entre um neurônio e sua célula alvo. Por isso, além de morfologicamente ela possuir dois compartimentos: um pré-sináptico e outro pós-sináptico (ver figura 2), ela processa basicamente dois tipos diferentes de informação: primeiro, no componente pré-sináptico, ela traduz o sinal elétrico vindo do axônio sob a forma de um potencial de ação (passo 1 da figura 2) em uma ação fisiológica, a exocitose de vesículas contendo neurotransmissores (passo 3). Essa transdução se dá pela abertura dos canais de cálcio sensíveis a voltagem presentes no terminal (passo 2) que permitem a entrada de cálcio no terminal, o que promove a exocitose das vesículas e a liberação dos transmissores na fenda sináptica (passo 3). Do lado pós-sináptico, a sinapse reconhece a natureza química do(s) neurotransmissor(e)s liberado(s) pelo meio de seus receptores e transforma esse sinal químico em um sinal elétrico na membrana na forma de uma alteração na diferença de potencial elétrico da membrana (pela abertura de canais iônicos) ou/e em outro sinal químico (como a produção de um segundo mensageiro como o cAMP<sup>1</sup>) que pode resultar em alterações morfo-funcionais no neurônio

<sup>1</sup> Adenosina monofosfato cíclica.

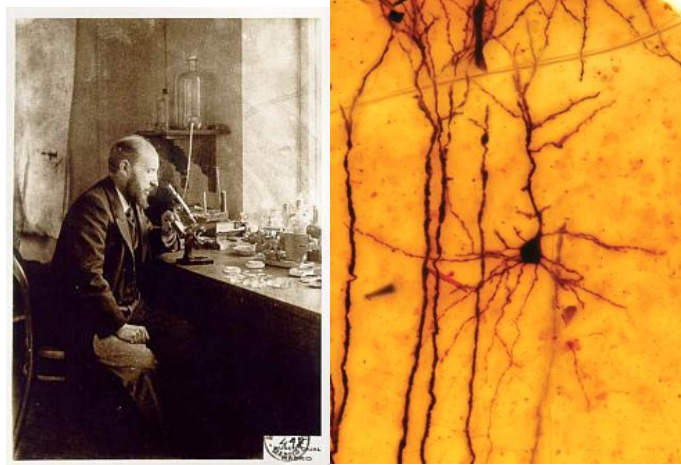
pós-sináptico. Para a compreensão exata dos mecanismos envolvidos na neurotransmissão é necessário ter em mente essa assimetria morfo-funcional e entender os mecanismos do processamento do sinal em ambos os lados da sinapse.



**Figura 2:** os dois lados da sinapse, os elementos pré- e pós-sináptico, e os passos da neurotransmissão. (Extraído de Hammond C. Cellular and Molecular Neurobiology. Academic Press, 1996).

## 2. Um pouco de história.

O termo sinapse foi cunhado por **Sir Charles Scott Sherrington** em 1897 para descrever as supostas zonas de contato entre os neurônios, sugeridas por **Santiago de Ramon y Cajal** em 1888. Cajal, trabalhando na Universidade de Valência na Espanha, concebeu a teoria da Doutrina Neuronal, que estabeleceu os neurônios como unidades funcionais discretas, ao contrário do que os anatomistas da época acreditavam (incluindo **Camilo Golgi**, que desenvolveu a técnica histológica usada por Cajal, e compartilhou com ele o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1906); os neurônios não formavam um retículo sincicial que ocuparia o sistema nervoso, como se imaginava. A doutrina Neuronal de Cajal também afirmava que os neurônios são células compartimentalizadas divididas em um soma e em dois tipos de prolongamentos, os dendritos e o axônio. Ainda mais, Cajal propôs que a informação viajava ao longo do axônio e era recebida pelos dendritos, que a transmitiam ao soma e do soma ele continuava pelo axônio do outro neurônio, o que ele chamou de “polarização dinâmica”. Esses postulados da Doutrina Neuronal de Cajal, feitos a partir de observações meticulosas da estrutura do sistema nervoso usando apenas um microscópio ótico simples e uma única técnica (a coloração e Golgi) são até hoje válidos e confirmados diariamente nos laboratórios de Neurofisiologia, o que o põe como um dos maiores cientistas que já existiram.



**Figura 3:** Ramon y Cajal e uma de suas preparações de neurônios corticais de camundongo.

Os estudos de Sherrington em Cambridge (que também ganhou um prêmio Nobel em 1921) sobre a fisiologia dos arcos reflexos puseram a sinapse como a estrutura básica integradora da fisiologia neuronal. Porém os mecanismos de como ocorreria a neurotransmissão eram totalmente obscuros. Evidências sugeriam que existiria um mediador químico que seria responsável pela transmissão do sinal nervoso na sinapse.

A substância acetilcolina já tinha sido identificada pelo fisiologista e farmacologista **Sir Henry Dale** no University College em Londres, mas foram os experimentos engenhosos de **Otto Loewi** na Universidade de Graz, na Austria, publicados em 1921 que demonstraram claramente que a neurotransmissão entre o nervo vago e o coração ocorria via um mediador químico. Foi demonstrado que a acetilcolina era o mediador da neurotransmissão vagal, e que era secretada por neurônios centrais e na junção neuromuscular. Assim a acetilcolina foi o primeiro **neurotransmissor** a ser identificado. Posteriormente a adrenalina foi identificada como substância neurotransmissora da adrenal e do sistema nervoso simpático.

A natureza química da neurotransmissão estava bem estabelecida nos anos 40, pelo menos no sistema nervoso periférico (**Sir John Eccles**, trabalhando na Austrália, demonstrou a natureza química da neurotransmissão central posteriormente em 1951), porém os mecanismos de liberação dos neurotransmissores ainda eram um mistério. Foi o alemão **Bernard Katz**, trabalhando em Londres nos anos 50 (agraciado com o Nobel de Medicina posteriormente em 1970) observando os pequenos potenciais elétricos, batizados por ele como potenciais miniatura da placa motora (mEPPs, do inglês *miniature endplate potentials*), que apareciam espontaneamente no músculo esquelético na região da placa motora, que propôs que os neurotransmissores seriam liberados de forma *quantal*<sup>2</sup>, ou seja, em pacotes com quantidades fixas de acetilcolina, e que o potencial de placa motora, que é produzido no músculo quando se estimula o nervo motor, seria a combinação de vários potenciais miniatura liberados em conjunto. Katz também determinou a natureza probabilística da liberação quantal da acetilcolina, observando que a distribuição das amplitudes dos eventos miniatura (que refletiam o número de pacotes de acetilcolina

---

<sup>2</sup> O termo quantal vem de *quantum*, pacote em grego. Katz propôs que a acetilcolina seria liberada em quantidades fixas, chamadas por ele de *quanta*.

liberados) seguia uma distribuição binomial (refletindo que cada pacote tem uma probabilidade de ser ou não liberado quando o nervo era estimulado). Os experimentos cuidadosos de Katz demonstraram inequivocamente que a acetilcolina era liberada em pacotes de 1.000 a 10.000 moléculas, mas a natureza desses pacotes na época era meramente especulativa. Mas o mistério não demorou muito tempo para se ter uma solução. Em 1955 de **Robertis e Bennet** publicaram suas observações de microscopia eletrônica em terminais nervosos mostrando a existência das vesículas sinápticas. Posteriormente na década de 60, essas vesículas foram purificadas do tecido nervoso central e a presença de neurotransmissores dentro das vesículas foi comprovada. Desde então a **teoria vesicular**<sup>3</sup> da liberação dos neurotransmissores se estabeleceu e vem sendo corroborada por diversos grupos de pesquisa usando diferentes metodologias, sendo aceita como o mecanismo geral de liberação de neurotransmissores na sinapse.

Apesar do grande tamanho dos terminais da junção neuromuscular, eles não eram apropriados para registros eletrofisiológicos pré-sinápticos. Mais tarde na década de 70, foram realizados experimentos seminais pelo neurocientista Mexicano, trabalhando na Itália, **Ricardo Miledi**, e pelo neurocientista Colombiano **Rodolfo Llinás**, trabalhando nos EUA, usando a preparação da sinapse gigante do gânglio estrelado da lula. Nessa preparação era possível realizar registros simultâneos pré- e pós-sinápticos, e nela eles demonstraram diretamente a dependência da neurotransmissão do aumento do cálcio intrasináptico, vindo do meio extracelular. 20 anos depois, na década de 90, os primeiros registros eletrofisiológicos em sinapses centrais de vertebrados foram realizados usando a técnica de *whole-cell patch-clamp*, primeiro pelo neurocientista Brasileiro, trabalhando nos EUA, **Henrique vonGersdorff** no laboratório do prof. **Gary Matthews**, em New York, na sinapse gigante do neurônio bipolar da retina do peixe-dourado, onde demonstraram diretamente a exocitose das vesículas sinápticas e sua dependência a entrada de cálcio usando registros de capacitância da membrana pré-sináptica. Logo depois, **Ian Forsythe**, na Universidade de Leicester no Reino Unido, realizou os primeiros registros em uma sinapse central de mamíferos, a sinapse gigante **cálice de Held**, localizado no núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB) no tronco cerebral auditivo. Devido a possibilidade de se realizar registros pré- e pós-sinápticos simultâneos, essa preparação passou a ser extensivamente estudada pelos fisiologistas sinápticos, confirmando as previsões de Katz feitas na junção neuromuscular, e por Miledi e Llinás na sinapse gigante da lula, e gerando uma grande quantidade de novos conhecimentos sobre a fisiologia do terminal pré-sináptico.

Foi proposto, em 1949, pelo psicólogo canadense **Donald Hebb** que alterações nos contatos sinápticos durante períodos de forte ativação de uma via específica poderiam gerar alterações na força sináptica nessas vias, o que seria um substrato neural do aprendizado e da memória. Isso permaneceu como uma hipótese e modelo teórico até que em 1973, **Timothy Bliss** e **Terje Lomo**, trabalhando com registros *in vivo* no hipocampo de coelhos anestesiados observaram pela primeira vez a potenciação a longo prazo das sinapses hipocámpais o primeiro fenômeno de plasticidade sináptica a longo prazo a ser descrito, mostrando que as sinapses não são elementos estáticos, mas dinâmicos podendo se modificar com a necessidade, como previsto por Hebb. Na mesma década, o neurocientista

---

<sup>3</sup> Ao contrário da **teoria citoplasmática** que afirma que os neurotransmissores seriam liberados diretamente do citoplasma. Veja mais detalhes adiante.

Austríaco-Americano **Eric Kandel**, trabalhando com o nudibrânquio *Aplysia*, estudando o reflexo de retirada das brânquias, descreveu os mecanismos moleculares e sinápticos do aprendizado, usando os fenômenos de habituação e sensibilização do reflexo. Desde então os estudos das bases sinápticas, celulares e moleculares vem se desenvolvendo de forma progressiva. Nas décadas seguintes os mecanismos da plasticidade sináptica foram investigados em grande detalhe por diversos neurocientistas em várias regiões cerebrais de diversos organismos, gerando grande conhecimento dos mecanismos de memória sináptica, porém ainda há muito o que se descobrir e esse é um dos mais excitantes campos de investigação as neurociências.

### 3. O neurotransmissor: o elo entre os dois lados da sinapse.

A necessidade de um mediador químico para a neurotransmissão a princípio pode parecer contraintuitiva e mais complexa do que simplesmente a transmissão passiva do sinal elétrico de um neurônio para o outro, já que ela introduz diversos passos metabólicos complicados para a síntese, estoque, liberação e recepção desses neurotransmissores, o que significa gasto energético e diminuição da rapidez de transmissão da informação nervosa. Por isso mesmo o conceito da neurotransmissão química encontrou tanta resistência inicialmente, mesmo de grandes nomes como John Eccles.

Porém a neurotransmissão química foi selecionada muito cedo evolutivamente, e isso fundamentalmente porque ela é significativamente mais eficiente do que a transmissão puramente elétrica. Veja o porquê abaixo.

1. A transmissão química confere **unidirecionalidade** à neurotransmissão, já que os neurotransmissores são liberados de um lado e se ligam a receptores presentes na célula vizinha. Já a sinapse elétrica pode transmitir a despolarização para ambos os lados, perdendo a característica de unidirecionalidade da sinapse. Entretanto, existem receptores pré-sinápticos, mas como será visto adiante eles participam na regulação por retroalimentação negativa ou positiva da neurotransmissão. Contrariando ainda mais a unidirecionalidade, a transmissão retrógrada dos dendritos para a sinapse já foi identificada em vários sistemas, como também será visto mais à frente; entretanto, esse tipo de transmissão também tem função basicamente de gerar alterações pré-sinápticas em resposta a sinais pós-sinápticos, e não em transmitir um sinal até o soma do neurônio pré-sináptico.
2. A sinapse química pode ser muito pequena em relação ao tamanho da região pós-sináptica, pois os neurotransmissores **amplificam** o sinal elétrico. As pequenas correntes geradas pela despolarização do pequeno botão sináptico não seriam suficientes para despolarizar efetivamente a área muito maior de contato da região pós-sináptica. E mesmo em sinapses grandes o tamanho do neurônio pós sináptico teria que ser pequeno para possuir uma resistência de membrana maior e poder se despolarizar efetivamente em resposta ao potencial de ação pré-sináptico.
3. A neurotransmissão química permite que um sinal do tipo tudo ou nada no lado pré-sináptico, como um potencial de ação, vire um sinal graduado do lado pós-sináptico, ou seja, em pequenas variações do potencial de membrana. Por isso podemos dizer que a sinapse é como um **conversor digital/analógico**. Isso vai ser crucial no processo de integração sináptica.
4. Os neurotransmissores podem transformar uma despolarização da membrana pré-sináptica em uma hiperpolarização pós-sináptica. Ou seja, a sinapse pode **inverter** a polaridade de um sinal. Da mesma forma os neurotransmissores podem converter o sinal elétrico em um sinal químico como a produção de um segundo mensageiro ou o influxo de cálcio, que

altera outras propriedades celulares, como a internalização de receptores e a expressão gênica, ou pela interação direta desses segundos mensageiros com canais iônicos, gerando alterações do potencial da membrana mais lentas, as quais alteram a resistência da membrana a longo prazo.

Ou seja, a sinapse química é muito mais “inteligente” do que a sinapse elétrica, pois pode transformar o sinal invariável que vem do axônio, o potencial de ação, em diferentes tipos de respostas no lado pós-sináptico. A inteligência é notadamente algo importante quando falamos de sistema nervoso.

Entretanto isso não significa que não existam sinapses elétricas. Elas existem e são feitas por meio de conexinas, as proteínas que formam as “gap junctions”. As sinapses elétricas não são a regra, mas existem e realizam funções específicas. A grande vantagem delas é a rapidez da transmissão. Enquanto que existe um lapso entre o potencial de ação pré-sináptico e a resposta pós-sináptica na sinapse química, esse lapso é extremamente curto na sinapse elétrica. Em situações em que a rapidez e sincronia da resposta são imperativas, as sinapses elétricas são apropriadas. Por exemplo, as células de Mautner no tronco cerebral do peixe recebem sinapses elétricas sensoriais que avisam o animal sobre algum perigo iminente, e permitem a ativação imediata desses neurônios que excitam os neurônios motores que inervam a musculatura da cauda, levando a fuga rápida do animal. No tálamo e no hipocampo muitos neurônios estão conectados por sinapses elétricas gerando ondas de atividade simultânea que sincronizam as atividades de vários neurônios ao mesmo tempo.

Mas são as sinapses químicas as grandes responsáveis pela troca de informações no sistema nervoso. E são os neurotransmissores as substâncias químicas que medeiam a troca de informação entre o lado pré- e pós-sináptico. Existem diversas substâncias que são consideradas neurotransmissoras. Podemos classificá-las genericamente em 3 classes: moléculas polares de baixo peso molecular - os **neurotransmissores clássicos** -, **peptídeos** e **moléculas apolares**. Na primeira classe encontram-se os neurotransmissores mais comuns responsáveis pela **neurotransmissão rápida**, mas também agindo na **neurotransmissão lenta** e na **neuromodulação** da transmissão rápida. Os peptídeos são basicamente **neuromoduladores** e as moléculas apolares são neuromoduladores e **transmissores retrógrados**.

Dentre os neurotransmissores clássicos temos os neurotransmissores responsáveis pela neurotransmissão rápida. Por neurotransmissão rápida entende-se a transmissão que causa mudanças rápidas no potencial elétrico transmembrana da célula pós-sináptica. Dentro desse grupo temos 11 substâncias consideradas neurotransmissoras e/ou neuromoduladoras, classificadas em quatro grupos, a saber:

1. acetilcolina
2. monoaminas
  - a. dopamina
  - b. noradrenalina
  - c. adrenalina
  - d. serotonina
  - e. histamina



3. aminoácidos
  - a. ácido gama-amino butírico (GABA)
  - b. glutamato
  - c. glicina
4. purinas
  - a. adenosina
  - b. ATP

Essas substâncias são sintetizadas no citoplasma do terminal sináptico por enzimas específicas (ou no caso do glutamato, glicina, adenosina e ATP por enzimas gerais do metabolismo celular), transportadas e estocadas em vesículas sinápticas e liberadas na fenda sináptica por exocitose vesicular, dependente de cálcio extracelular, quando da chegada de um potencial de ação<sup>4</sup>. Uma vez liberadas essas moléculas são degradadas ou recaptadas pelos astrócitos, ou pelos terminais e reutilizadas ou resintetizadas a partir de seus precursores para posterior estoque vesicular e exocitose.

Os neuropeptídeos formam um grupo muito abrangente de pequenas proteínas (peptídeos) que são liberados pelas terminações nervosas neuronais e agem como neurotransmissores e neuromoduladores na célula alvo. O sistema nervoso secreta também peptídeos que tem função trófica (como o fator de crescimento neuronal, NGF) ou hormonal, e embora eles não sejam classificados como transmissores pode existir uma razoável sobreposição funcional.

Diversas diferenças existem na síntese e na secreção dos neuropeptídeos em relação a dos neurotransmissores clássicos. Os neuropeptídeos são sintetizados no soma na forma de pré-peptídeos e processados pós-translacionalmente em peptídeos ativos, um passo gerador de diversidade. No soma esses peptídeos são estocados em vesículas grandes e densas que são formadas no complexo de Golgi e transportadas cheias até o terminal sináptico onde sofrem exocitose cálcio-dependente quando da chegada dos potenciais de ação. Uma vez liberados, esses peptídeos são destruídos por peptidases, porém diferente dos transmissores clássicos, os produtos de degradação desses peptídeos não são reciclados em novos peptídeos na sinapse.

A última classe de neurotransmissores engloba uma família de moléculas diversas que tem em comum o fato de serem solúveis em lipídios e de não serem estocadas em vesículas sinápticas. Nessa classe estão os transmissores apolares, sendo o óxido nítrico e os endocanabinóides seus mais conhecidos representantes. Apesar de serem substâncias químicas bem distintas (o óxido nítrico é um gás e radical livre, enquanto os dois endocanabinóides conhecidos. A anandamida e o 2-arquidonoil-glicerol são lipídios derivados do ácido araquidônico) o *modus operandi* desses transmissores é semelhante. Por poderem atravessar as bicamadas lipídicas essas moléculas não se prestam para estoque em vesículas (além de o óxido nítrico ser um radical livre, ou seja, uma substância instável). Por isso essas substâncias são sintetizadas em resposta a algum estímulo que leve a um aumento do cálcio citoplasmático, e imediatamente se difundem através da membrana celular até a célula-alvo. O óxido nítrico se difunde para o citoplasma da célula alvo e ativa

---

<sup>4</sup> Porém os mecanismos de liberação de ATP e adenosina ainda são pouco conhecidos, embora haja evidências de liberação vesicular de ATP

moléculas efetoras presentes no citoplasma (no caso a ciclase do GMP, guanosina monofosfato). Já os endocanabinóides possuem receptores de membrana específicos, chamados CB1. O curioso é que esses tipos de transmissores estão principalmente envolvidos no processo de retrotransmissão, ou seja, são sintetizados nos dendritos, liberados e atuam nos terminais sinápticos, sendo contrário à lógica normal da neurotransmissão. Esse tipo de retrotransmissão possibilita à célula pós-sináptica comunicar alguma alteração fisiológica ao terminal, possibilitando um ajuste na neurotransmissão em resposta ao estado do neurônio-alvo. Vamos ver que esse é um mecanismo bastante usado nos fenômenos de **plasticidade sináptica**.

#### 4. Mecanismos de secreção de neurotransmissores.

Já está amplamente estabelecido que os neurotransmissores são secretados por meio da exocitose de vesículas sinápticas (com exceção dos transmissores apolares como visto acima). Porém já houve certa resistência em se aceitar o modelo de liberação vesicular dos neurotransmissores. Um grupo em especial propõem que o neurotransmissor acetilcolina seria liberado por uma proteína da membrana sináptica chamada mediatóforo que foi identificada no órgão elétrico da raia *Torpedo*. Essa proteína quando reconstituída ou expressa em sistemas heterólogos tem a capacidade de liberar acetilcolina de forma aparentemente quantal (ver mais adiante) e dependente de cálcio. Esse grupo propõe modelo semelhante para a liberação de GABA e glutamato e as vesículas sinápticas serviriam apenas como um estoque regulador de acetilcolina, ATP e cálcio e uma via alternativa para a liberação dos transmissores. Entretanto a própria existência do mediatóforo não inviabiliza o modelo vesicular da liberação de neurotransmissores, já que um número muito grande de evidências sugere que os neurotransmissores são liberados pela exocitose das vesículas. Veja uma lista *top 10* dessas evidências abaixo:

1. Todas sinapses químicas possuem vesículas.
2. As vesículas sinápticas concentram neurotransmissores.
3. As vesículas sinápticas possuem um maquinário complexo dedicado à exocitose.
4. As vesículas sinápticas são flagradas por microscopia eletrônica em processo de exocitose quando o terminal é estimulado.
5. Inibidores do transporte vesicular de transmissores ou da V-ATPase reduzem drasticamente a liberação de neurotransmissores.
6. O tamanho quantal (ver adiante) independe da concentração de transmissores citoplasmáticos.
7. A concentração estimada de transmissores vista por um receptor pós-sináptico é maior do que a concentração citoplasmática de transmissores.
8. Moléculas aplicadas do lado extracelular da sinapse aparecem no interior de vesículas sinápticas depois das sinapses serem estimuladas e secretar transmissores, e somem se um novo trem de estímulos é aplicado, refletindo a endocitose e a exocitose dessas vesículas.
9. Toxinas clostridiais que clivam proteínas envolvidas no processo de exocitose (ver adiante) inibem forte e persistentemente a neurotransmissão. A  $\alpha$ -latrotoxina que induz a exocitose maciça das vesículas sinápticas produz uma depressão persistente da neurotransmissão.
10. Medidas de capacitância em terminais glutamatérgicos gigantes mostram que após o influxo de cálcio no terminal existe um aumento de área (refletido pelo aumento da capacitância) do terminal que seria a incorporação das membranas excitadas, em paralelo com a geração das correntes pós-sinápticas glutamatérgicas. Bem como uma diminuição da capacitância mais lenta refletindo sua endocitose. Esse aumento na

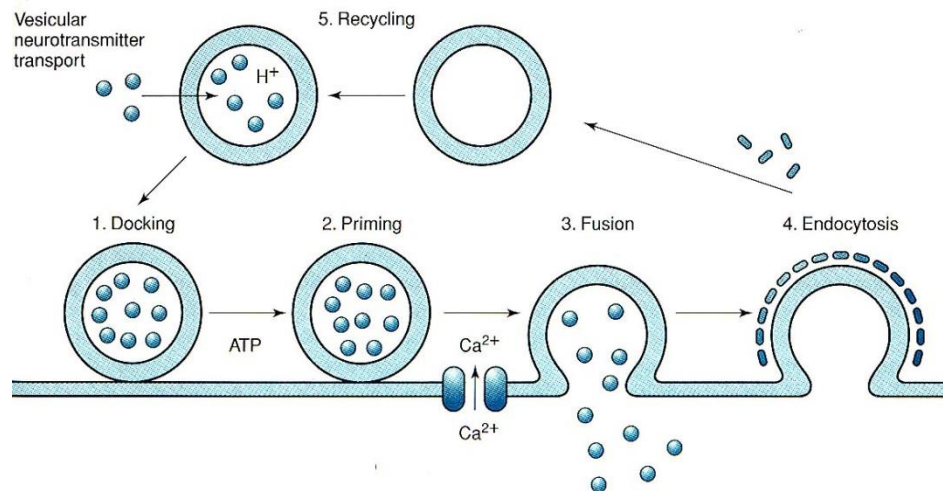
capacitância depende do influxo de cálcio e é saturável, ou seja, evidencia que o *pool* de vesículas liberáveis é limitado.

Apenas usando a lógica da Navalha de Occam<sup>5</sup> fica óbvio que a presença de um sistema complexo de armazenamento e liberação de transmissores na sinapse como as vesículas não deve existir apenas para servir a um processo secundário e que todas as evidências acima seriam apenas epifenômenos das condições experimentais. Diante de diversas evidências que suportam a liberação vesicular dos transmissores contra apenas uma que suporta a liberação citoplasmática, não há mais dúvidas na comunidade científica que as vesículas sinápticas são organelas de estoque e liberação de neurotransmissores na sinapse.

As vesículas são classificadas em dois tipos: (1) as vesículas sinápticas clássicas que aparecem claras e pequenas em microscopia eletrônica, que estocam os neurotransmissores clássicos e (2) as grandes vesículas que apresentam um núcleo eletrodenso que são denominadas de *large dense core vesicles* (LDCVs), que estocam os neuropeptídeos. Além da morfologia, essas vesículas possuem características fisiológicas distintas como pode ser visto na tabela abaixo. Trataremos a partir daqui basicamente da fisiologia das vesículas sinápticas clássicas, o chamado ciclo das vesículas sinápticas (figura 4).

Tipo de vesícula	Diâmetro (nm)	Localização	Conteúdo	Ca <sup>2+</sup> necessário para exocitose (μM)
Pequena	40	Zonas ativas	Pequenas moléculas	10-200
LDCV	80-120	Ectópicas	Peptídeos; adrenalina em células cromafins da supra-renal	5-10

**Tabela 1:** características das vesículas sinápticas.



**Figura 4:** o ciclo das vesículas sinápticas.

<sup>5</sup> A regra heurística da “navalha de Occam” (*Occam's Razor*) postula que dentre duas hipóteses plausíveis a mais simples e/ou a que pede menos assunções e postulados para ser explicada provavelmente é a correta.

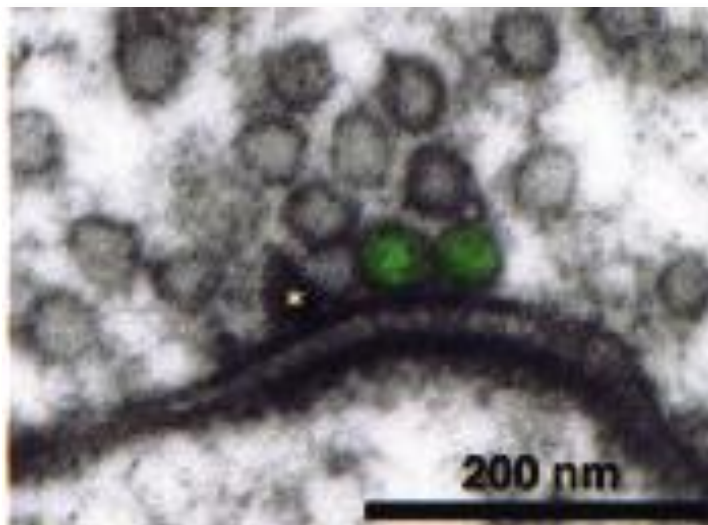
Vesículas sinápticas são organelas geradas no soma e transportadas até o terminal por **transporte axonal anterógrado**. No terminal, as vesículas sinápticas devem então ser preenchidas ativamente com neurotransmissores. Os transmissores são concentrados nas vesículas por meio de transportadores específicos que usam o gradiente de pH existente entre a vesícula sináptica e o citoplasma para transportar ativamente o transmissor para dentro da vesícula. Esse gradiente é criado pela ação de uma **ATPase do tipo V**. A inibição da atividade dessa ATPase por **bafilomicina** impede que as vesículas sejam preenchidas com transmissores e conseqüentemente inibem a neurotransmissão. Existem transportadores específicos para os diversos transmissores clássicos. Os transportadores de acetilcolina (VACHT1) e monoaminas (VMAT2<sup>6</sup>) usam o gradiente de químico de prótons (pH) como força eletromotriz para o transporte. Esses transportadores possuem inibidores farmacológicos específicos. O transporte vesicular de monoaminas é inibido pela **reserpina**, enquanto que o transporte vesicular de acetilcolina é inibido pelo **vesamicol**. O transporte vesicular de glutamato é realizado por dois transportadores já identificados, VGLUT1 e VGLUT2, e usam o gradiente eletroquímico ( $\Delta\psi$ ) gerado pela V-ATPase. Já GABA e glicina usam o mesmo transportador (VGAT1) e dependem tanto do gradiente químico (pH) quanto do eletroquímico ( $\Delta\psi$ ). Não são conhecidos inibidores farmacológicos específicos desses transportadores, embora diversos corantes como **Tripán Blue** e **Rose Bengal** inibam o transporte vesicular de glutamato.

Depois de cheias as vesículas precisam entrar no ciclo exocitótico. As vesículas sinápticas não se distribuem aleatoriamente no terminal, mas devem ser direcionadas aos seus sítios de liberação na membrana sináptica, as **zonas ativas**. As zonas ativas podem ser identificadas por microscopia eletrônica como uma região eletrodensa da membrana onde se concentram vesículas sinápticas (Figura 5). Nas zonas ativas estariam concentradas do lado pré-sináptico a maquinaria necessária para a exocitose (diversas proteínas e canais de cálcio sensíveis à voltagem) e do lado pós-sináptico os receptores dos neurotransmissores. As vesículas que estão prontas para serem liberadas se concentrariam nas zonas ativas próximas aos canais de cálcio e se fundiriam rapidamente à membrana em resposta ao influxo de cálcio pelo canal. Esse processo tem uma latência em torno de 0,2 ms após a chegada do potencial de ação pré-sináptico, significando que essas vesículas devam estar prontas para serem liberadas, não necessitando, nesse estágio, de passos enzimáticos complicados que envolvam hidrólise de ATP. Esse *pool* de vesículas que estão prontas para serem liberadas é conhecido como o *Readly Releasable Pool* (**RRP**; *pool* prontamente liberável) que na sinapse central mais estudada, a de neurônios hipocámpais em cultura, compreenderia entre 5 a 8 vesículas. Cada vesícula dessas teria uma probabilidade ( $p_r$ ) de ser liberada quando da chegada de um potencial de ação. Essa probabilidade normalmente é baixa, sendo liberada geralmente uma vesícula por vez, e muitas vezes nenhuma vesícula chega a ser liberada. Mesmo assim ainda é um *pool* pequeno para sustentar um estado de atividade intensa. Compreensivelmente outro *pool* vesicular foi identificado e chamado de ***pool* reciclável** (ou reserva), que nessa sinapse hipocámpal, compreenderia entre 17 e 20 vesículas. Esse *pool* seria recrutado após a depleção do RRP e, junto com o RRP compreendem o ***pool* liberável** de vesículas sinápticas, que teria então entre 20 e 25

---

<sup>6</sup> O VMAT1 é um transportador de monoaminas não neuronal.

vesículas. Esse *pool* é usado e reusado e é responsável pela manutenção da neurotransmissão em uma sinapse.



**Figura 5:** Micrografia eletrônica de uma sinapse glutamatérgica central mostrando a zona ativa (região mais eletrodensa da membrana) e as vesículas sinápticas. As vesículas marcadas em verde representariam o RRP (Taschenberger et al., *Neuron*, 2012).

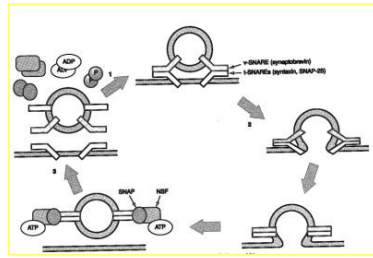
Entretanto a análise morfológica das sinapses de neurônios hipocámpais em cultura revela que em um terminal sináptico existem cerca de 200 vesículas em torno de uma zona ativa. Essas aproximadamente 180 vesículas a mais aparentemente não participam do processo de neurotransmissão em condições normais. Esse *pool* de vesículas é chamado de ***pool reserva*** (ou ***em repouso***), e existem evidências que ele seja mobilizado quando o *pool* liberável é depletado em situações de estímulo intenso. Além de possivelmente servir como um *pool* de manutenção. Então a neurotransmissão é mantida por um pequeno número de vesículas que são constantemente recicladas, repletas e entram novamente no *pool* liberável. Essa particularidade levou inicialmente, no início da década de 70, a se postular que os neurotransmissores (no caso específico, a acetilcolina) fossem liberados do citoplasma, e só depois de intensa estimulação os neurotransmissores contidos nas vesículas fossem liberados. Isso porque quando se marcava o tecido nervoso com colina (o precursor da acetilcolina) triciada (contendo um átomo de trício, um isótopo radioativo do hidrogênio), a radioatividade específica da acetilcolina liberada por estimulação da preparação se assemelhava mais a da acetilcolina citoplasmática do que a da acetilcolina vesicular. Mas posteriormente experimentos marcando as vesículas colinérgicas que realizavam exocitose do órgão elétrico do *Torpedo* com dextrana (as vesículas capturavam a dextrana no momento da exocitose e a incorporavam durante a endocitose) demonstraram que as vesículas ativas compreendiam uma pequena parte do conjunto total de um terminal e que a atividade específica da acetilcolina triciada dessas vesículas se assemelhava à da acetilcolina liberada, mostrando que essas vesículas capturavam ativamente a acetilcolina citoplasmática e a liberavam em resposta a estimulação. Outros experimentos em diferentes preparações corroboraram esses resultados, mostrando que apenas uma pequena fração das vesículas totais participa ativamente do processo de neurotransmissão.

Os processos de exocitose e endocitose das vesículas sinápticas são similares a outros processos de exo e endocitose de outras células eucarióticas, e usam as mesmas classes de proteínas. Muito do que se sabe sobre os passos e as proteínas envolvidas na exocitose das vesículas vem também do estudo de preparações não-neuronais como as leveduras. Os mecanismos de exocitose, endocitose e reciclagem das vesículas sinápticas embora de uma forma geral já sejam estabelecidos, possuem vários detalhes importantes ainda obscuros. Sabemos que existem alguns passos teóricos que devem ser cumpridos antes que uma vesícula esteja pronta para sofrer exocitose. Primeiro ela deve ser mobilizada dos seus sítios de fixação no citoesqueleto e **ancorada** nos sítios de liberação nas zonas ativas. Essa fase é chamada de ancoramento (*docking*). A mobilização das vesículas dos sítios no citoesqueleto parece envolver a fosforilação induzida por cálcio (via proteína calmodulina cinase II) da proteína vesicular **sinapsina** que estaria ligada a actina do citoesqueleto. Depois de ancorada as vesículas precisam ser preparadas para a exocitose. Esse passo é chamado de **priming** e necessita da hidrólise de ATP. Os passos exatos do ancoramento e do *priming* são ainda controversos, bem como as proteínas envolvidas. Contra-intuitivamente as proteínas que formam o complexo **SNARE** (ver abaixo) não são responsáveis pelo ancoramento específico nas zonas ativas. As proteínas **n-sec1** (munc18), **rab3** (uma proteína que liga GTP) e **sinaptotagmina** (veja abaixo) são candidatas a participarem nos processos de ancoramento e/ou *priming*.

Os processos acima preparam as vesículas para serem rapidamente excitadas em resposta ao influxo de cálcio pré-sináptico. As principais proteínas envolvidas no processo de exocitose são conhecidas. Elas formam o chamado complexo SNARE (de *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor-attachment protein receptor*: figura 6). Esse complexo é formado basicamente por 3 proteínas: uma v-SNARE (SNARE vesicular) e duas t-SNARE (SNARE alvo, *target*, na membrana sináptica). A v-SNARE é a **sinaptobrevina** (também conhecida como **VAMP**), enquanto que as t-SNARES são a **sintaxina** e a **SNAP-25**. A função das proteínas do complexo SNARE é a de formar um complexo que quando ativado aproxima a membrana da vesícula sináptica com a do terminal sináptico para promover a fusão das membranas e a exocitose. As 3 proteínas SNAREs se entrelaçariam aproximando a vesícula da membrana. Evidências da participação do complexo SNARE na exocitose vêm da reconstituição do complexo SNARE *in vitro*, onde as 3 proteínas SNAREs formam um complexo 1:1:1 resistente ao tratamento com os detergentes Triton X-100 ou SDS; da fusão *in vitro* de vesículas contendo sinaptobrevina com vesículas contendo quantidades iguais de SNAP-25 e sintaxina; e principalmente da ação das toxinas clostridiais. As **toxinas botulínicas** e **tetânica** são zinco-endoproteases que clivam especificamente proteínas do complexo SNARE. O envenenamento dos terminais por essas toxinas provocam uma inibição da neurotransmissão persistente, já que novas proteínas não são sintetizadas no terminal, mas precisam ser transportadas por transporte axonal anterógrado do soma até o terminal. Curiosamente a injeção de toxina tetânica no terminal gigante da lula bloqueia a neurotransmissão, mas não diminui o número de vesículas ancoradas. Resultado similar é observado em terminais nervosos de *Drosophila* que sofreram a deleção do gene da sintaxina, mostrando que a formação do complexo SNARE é um passo posterior ao ancoramento das vesículas.

É importante notar que a fusão de duas bicamadas lipídicas envolve uma barreira energética muito grande, que seria a exposição temporária do interior hidrofóbico da membrana ao meio aquoso. Assim energia é requerida para realizar a fusão. A formação

do complexo SNARE e a exocitose vesicular não necessita de ATP, então de onde veria a energia para o processo? A interação das proteínas SNARE é um processo termodinamicamente favorável com liberação de energia livre. Então temos um complexo protéico de alta energia. Após a exocitose se quisermos reciclar as proteínas, precisamos de uma fonte de energia livre para desfazermos o complexo para que a sinaptobrevina seja reciclada junto com as vesículas e a formação posterior de novo complexo. Esse passo é feito por uma ATPase chamada Fator Sensível a N-Etilmaleimida (**NSF**) em conjunto com suas proteínas ligantes citoplasmáticas as **SNAPs**, que usando a energia livre do ATP desnovelariam as SNAREs após a reciclagem vesicular, redirecionando as t-SNAREs à membrana e permitindo o reuso da vesícula.



**Figura 6:** o ciclo do complexo SNARE.

Outra proteína proposta que ajudaria a vencer essa barreira energética da fusão de membranas seria o **poro de fusão**. Essa proteína formaria um poro entre a vesícula e a membrana permitindo o fluxo de transmissores por ele. Posteriormente a vesícula se fundiria com a membrana ou mesmo o poro se fecharia e a vesícula vazia seria preenchida (ver abaixo sobre os modelos de endocitose). Evidências da existência do poro existem em grânulos de células cromafins e de mastócitos. A presença dele em sinapses é puramente especulativa. A identidade mais provável desse poro seriam as proteínas *conexinas* que formam as *gap-junctions*.

Como o complexo SNARE alteraria sua conformação para permitir a fusão das membranas? Sabemos que a neurotransmissão depende estritamente do cálcio externo. Deve existir então um sensor de cálcio que sente o aumento do cálcio intrasináptico que ocorre devido à abertura dos canais de cálcio sensíveis a voltagem pré-sinápticos<sup>7</sup>, em resposta à chegada do potencial de ação. Diversas evidências levam a crer que uma classe de proteína vesicular, as **sinaptotagminas**, é o sensor de cálcio da neurotransmissão. Essas proteínas possuem dois sítios de ligação para o cálcio, além de interagirem com o complexo SNARE e com fosfolipídios, de forma dependente de cálcio. Camundongos *knock-out* para a sinaptotagmina I possuem uma neurotransmissão fraca e assíncrona. Evidências semelhantes foram encontradas em mutantes para as sinaptotagminas em moscas e em nematódeos. Além disso, mutações que alteram a afinidade da sinaptotagmina ao cálcio alteram concomitantemente a sensibilidade da neurotransmissão ao cálcio. Acredita-se que

<sup>7</sup> Os canais de cálcio sensíveis a voltagem sinápticos (VSCCs-*voltage dependent calcium channels*) são distintos dos canais de cálcio presentes no soma ou dos canais de cálcio presentes em células musculares e em células neuroendócrinas (canais do tipo L). Os VSCCs sinápticos são dos tipos N e P/Q e são sensíveis às toxinas  $\omega$ -conotoxina GVIA e  $\omega$ -Agatoxina IVA ou  $\omega$ -conotoxina MVIIC, respectivamente, enquanto que os canais L são sensíveis a dihidropiridinas (DHPs). Essas e outras neurotoxinas animais são ferramentas extremamente úteis para a investigação fisiológica e farmacológica de canais iônicos neuronais, devido a atuarem em canais iônicos específicos.



a interação da sinaptogamina com o cálcio promova a interação dessa proteína com lipídios e com o complexo SNARE que levarão à torção do complexo SNARE e à fusão das membranas. Outra proteína ligante de cálcio que participa da neurotransmissão é a **calmodulina**, porém sua função é moduladora e não efetora.

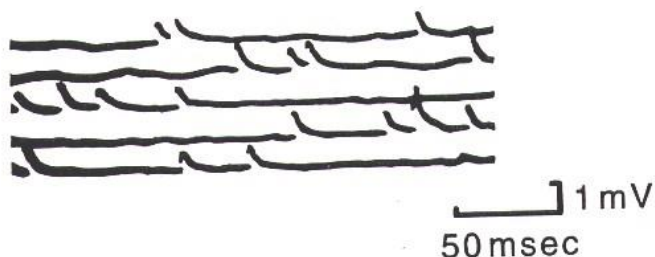
A sinaptotagmina ligada a fosfolipídios possui uma constante de dissociação para o cálcio em torno de 10  $\mu\text{M}$ . Essa afinidade baixa condiz com o observado em sinapses gigantes como as dos neurônios bipolares da retina e a sinapse cálice de Held, do complexo oliváceo superior, onde a neurotransmissão é evocada em concentrações acima de 10  $\mu\text{M}$  de cálcio. Entretanto o aumento global do cálcio intrasináptico observado após a chegada do potencial de ação, ou mesmo após despolarizações mais fortes, mal chega a 100 nM. Fica claro que aumentos locais na concentração de cálcio devem ser responsáveis pela ativação da exocitose. Além disso, a injeção do quelante lento de cálcio, EGTA, na sinapse gigante da lula, não é efetiva em inibir a neurotransmissão, enquanto que a injeção do quelante rápido BAPTA é eficiente em inibir a neurotransmissão. Essas evidências sugerem que os canais de cálcio devem se localizar bem próximos da maquinaria de exocitose para que o sensor de cálcio seja capaz de sentir as concentrações locais grandes de cálcio próximas a abertura do canal. Teríamos então que a neurotransmissão seria sensível a **microdomínios** de cálcio, e não ao cálcio global sináptico. De fato os canais de cálcio sinápticos interagem com as proteínas da membrana sináptica **neurexina** que interage com a sinaptotagmina. Calcula-se que nesses microdomínios a concentração do cálcio após a abertura dos canais chegaria a 100  $\mu\text{M}$  a 50 nM da boca do canal, uma concentração suficientemente alta para desencadear a exocitose das vesículas sinápticas. Têm-se evidências também que deva existir sobreposição de microdomínios que contribui para a liberação de uma vesícula. Essa sobreposição ajuda a explicar a cooperatividade positiva que se observa na relação entre o cálcio extracelular e a liberação de neurotransmissores. É importante notar que a concentração fisiológica de cálcio se situa aproximadamente no meio da curva dose-resposta do efeito do cálcio sobre a neurotransmissão. Portanto pequenas alterações no cálcio extracelular devido a pequenas alterações nas correntes de cálcio pré-sinápticas levam a grandes alterações na neurotransmissão. Por essa razão os canais de cálcio pré-sinápticos são alvo de diversos moduladores pré-sinápticos da neurotransmissão.

Após a exocitose da vesícula ela precisa ser reciclada para o reuso (e também porquê senão a membrana sináptica aumentaria constantemente de tamanho!). A via clássica envolve a formação de *coated pits* onde a membrana da vesícula incorporada à membrana sináptica é recoberta com a proteína **clatrina**, e com o auxílio de outras proteínas como a **sinaptojanina**, **anfifisina** e **dinamina**, ela é recuperada e reincorporada ao ciclo vesicular provavelmente após uma passagem por um compartimento endossomal. Esse processo ocorreria ao redor de um minuto com uma constante de tempo de 15 a 25 segundos após um estímulo de média intensidade. A via clássica é muito bem estudada e definitivamente é fundamental no processo de reciclagem vesicular, porém ela não é suficiente para explicar todas as observações feitas sobre reciclagem vesicular até então, especialmente porquê existem evidências que exista uma via muito rápida de endocitose que ocorreria em 1 segundo. Um modelo alternativo para explicar essa via rápida (*fast-track*), propõe que as vesículas não se incorporem completamente à membrana, mas que apenas uma fusão controlada da membrana ocorra (ou a formação do poro de fusão), o

conteúdo de transmissor da vesícula seja liberado e as membranas sejam separadas e a vesícula incorporada ao *pool* liberável, e repreenchida ficando imediatamente pronta para ser excitada novamente. Esse modelo foi batizado de ***kiss-and-run***, e a existência dele nas sinapses é motivo de ampla controvérsia entre diferentes grupos de cientistas. O modelo é bastante atrativo, pois é econômico e rápido, ao contrário da via clássica que envolve várias proteínas, gasto de energia e é lento. Por outro lado o *kiss-and-run* necessitaria de algum mecanismo, ainda não identificado, que impeça o colapso total da membrana vesicular que ocorreria durante a fusão. Esse modelo significaria que as vesículas retêm sua identidade após liberadas, sendo remobilizadas para o seu *pool* original, enquanto que na via clássica ainda não está claro se as membranas endocitadas correspondem exatamente as vesículas excitadas. Finalmente um último modelo de endocitose é proposto quando há eventos intensos de excitação e muitas vesículas sinápticas se fundem a membrana em um curto espaço de tempo. Esse modelo é chamado de endocitose ***bulk*** (“pesada”), onde pedaços grandes da membrana sináptica em excesso são endocitados e se fundem em vacúolos e cisternas que seriam intermediários dos endossomas, e as vesículas sinápticas seriam re-formadas a partir dessa estrutura. Apesar de existirem diversas evidências desse mecanismo, os mecanismos moleculares exatos dessa via são ainda especulativos.

### 5. Análise estatística da neurotransmissão.

Como já foi explicado, Bernard Katz nos tempos heroicos da eletrofisiologia registrando a neurotransmissão na junção neuromuscular da rã determinou que a acetilcolina é liberada sob a forma de “pacotes” de acetilcolina de “tamanho” similar. O tamanho era medido pela amplitude dos **potenciais miniatura da placa motora (minis)** que refletia a acetilcolina liberada espontaneamente pela sinapse (figura 7).



**Figura 7:** os potenciais miniatura de placa motora.

Essas “pacotes” foram batizados de **quanta**, e propostos serem a unidade mínima da neurotransmissão. Logicamente o tamanho do potencial da placa motora seria equivalente ao número de quanta liberados pelo potencial de ação. Para demonstrar essa hipótese Paul Fatt e Katz estimularam o nervo motor em uma solução com baixo cálcio e alto magnésio, situação que eles já sabiam que diminuiria muito a quantidade de acetilcolina liberada. Nessas condições, a estimulação ao invés de produzir um potencial de placa motora grande e supralimiar (que sempre produziria um potencial de ação), produzia pequenos potenciais que se assemelhavam aos minis. Analisando a distribuição de amplitudes desses potenciais miniatura observou-se que eles também se distribuíam como múltiplos de uma amplitude mínima e que a distribuição dessas amplitudes seguia um modelo **binomial** (figura 8), ou seja, que cada quanta tinha a mesma probabilidade de ser liberado ou não, como se cada vesícula (quanta) quando chegasse o potencial de ação jogasse uma moeda e dependendo do resultado (cara ou coroa) resolvesse realizar exocitose ou não<sup>8</sup>.

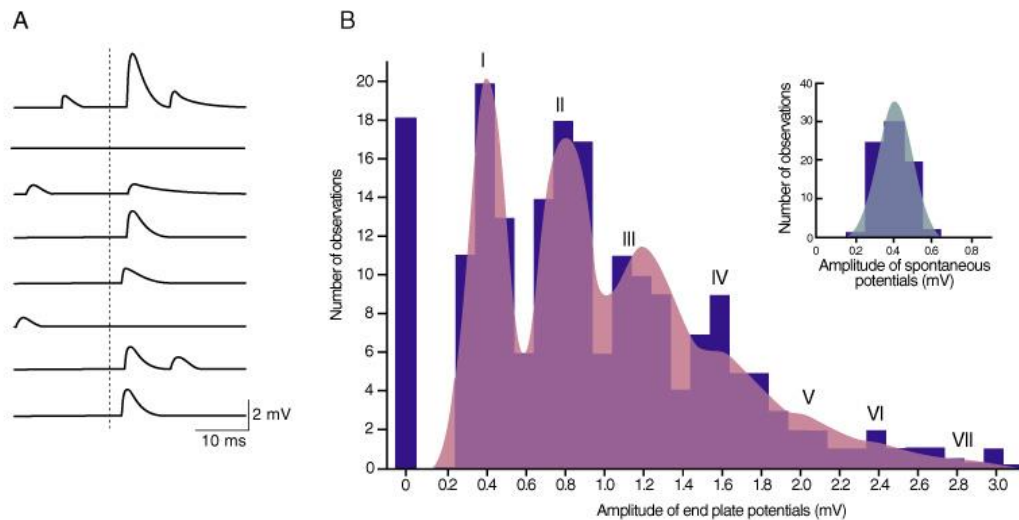
Esse modelo, que foi posteriormente confirmado em várias outras sinapses, inclusive centrais, diz que cada vesícula em uma sinapse tem uma probabilidade fixa de ser liberada quando da chegada do potencial de ação e que o número de vesículas liberadas por potencial de ação (**m**) depende do produto da probabilidade de liberação (**p<sub>r</sub>**) e do número de vesículas disponíveis para serem liberadas (**n**):

<sup>8</sup> Evidentemente com a moeda a probabilidade de liberação seria de 0,5. Mas a probabilidade observada era bem menor-como na maioria das sinapses. Então imagine uma moeda “viciada” ou um dado com um ou dois lados apenas marcando “liberação” e os outros marcando “fique aonde está”.

$$m = n \cdot p_r$$

O parâmetro  $m$  é chamado de **conteúdo quantal**, e reflete quantas vesículas sinápticas são liberadas por um potencial de ação. Quando se mede a corrente ou potencial sináptico (PSC ou PSP, respectivamente) gerado por um potencial de ação, podemos calcular  $m$  se soubermos o **tamanho quantal (Q)** da sinapse. O tamanho quantal é a amplitude do evento quantal mínimo, ou seja, o evento miniatura. Sabendo-se  $Q$  podemos calcular  $m$  simplesmente dividindo a amplitude do PSC (se medirmos corrente) por  $Q$ . Os parâmetros  $m$  e  $Q$  são de medição relativamente fácil. Porém  $p_r$  e  $n$  são parâmetros difíceis (muitas vezes impossíveis) de serem determinados e de serem definidos com precisão. O valor de  $n$  poderia representar o RRP ou o número de sinapses, ou essa combinação. O valor de  $p_r$  seria a combinação de várias probabilidades, incluindo a de o potencial de ação chegar ao terminal, que resultariam na decisão final de liberar ou não a vesícula. Diferentes sinapses incidindo no mesmo neurônio podem ter diferentes valores de  $p_r$ , adicionando mais complexidade a medida.

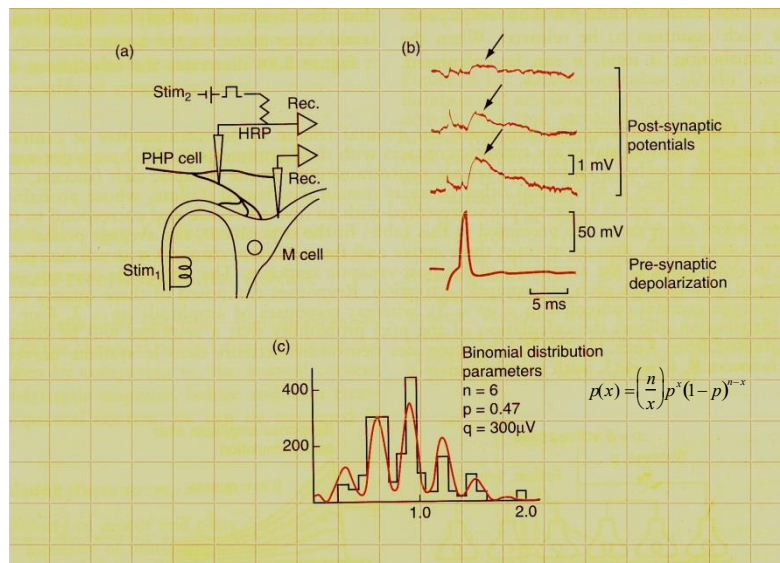
Os experimentos na junção neuromuscular são mais fáceis de interpretar, já que temos uma sinapse com várias zonas ativas, mas com características homogêneas. Em neurônios centrais cada neurônio pode receber diferentes tipos de sinapses que poderão ter diferentes valores de  $p_r$  e  $Q$ , que podem complicar a análise quantal.



**Figura 8:** análise da neurotransmissão quantal na junção neuromuscular do rato. Em A temos os potenciais pós-sinápticos medidos em condição de baixa probabilidade de liberação (com baixo cálcio e alto magnésio no banho). O traçado vertical representa o momento da estimulação do nervo motor. Os potenciais anteriores ao estímulo representam eventos espontâneos. Em B temos o histograma de distribuição de amplitudes. No ponto zero mV temos o número de falhas e em seguida a distribuição das diferentes amplitudes, que tenderam a se agrupar em torno de múltiplos de 0,4 mV, que corresponde à amplitude média dos eventos miniaturas, como pode ser visto no inserto. Na parte sombreada temos o ajuste do histograma por uma distribuição de Poisson ( $P_x = m^x e^{-m}/x!$ ). Os algarismos romanos representam o número de quanta de cada componente da distribuição.

Porém os estudos de sinapses centrais têm confirmado o modelo quantal e ajudado em sua interpretação. Por exemplo, um experimento clássico usando a célula de Mautner do bulbo de peixes teleosteos. Esse neurônio recebe um número limitado de aferentes inibitórios glicinérgicos de interneurônios locais, sendo possível fazer registros

simultâneos do neurônio pré e do pós- sináptico. A estimulação do neurônio pré-sináptico resulta em potenciais pós-sinápticos que podem ser avaliados de forma semelhante ao feito no experimento da junção neuromuscular da figura 8 (figura 9). A distribuição de amplitudes pode ser descrita por um modelo binomial. Após o registro, o neurônio pré-sináptico é marcado com peroxidase de rabanete (HRP) e o número de sinapses no neurônio pós-sináptico avaliado por microscopia eletrônica. Foi observado que: i) cada sinapse continha apenas uma zona ativa; ii) o n obtido pelo melhor ajuste da função binomial era igual ao número de sinapses. A conclusão é que, nessa preparação, n representaria o número de zonas ativas ou nesse caso de sinapses, e que cada zona ativa libera uma vesícula por vez. Esse experimento definiu fisicamente a variável n como o número de sinapses, e criou um paradigma de que cada zona ativa pode liberar apenas uma vesícula por vez, ou **liberação univesicular**.



**Figura 9:** experimentos usando a célula de Mauthner do bulbo de teleosteos. Em a) temos o esquema da preparação. Em b) os registros pós- e pré-sinápticos. Em c) a distribuição das amplitudes e o ajuste segundo o modelo binomial (equação).

Outras evidências da teoria univesicular foram obtidas em outras preparações centrais, porém recentemente evidências têm mostrado que em certas sinapses não apenas uma zona ativa poderia liberar mais de uma vesícula por vez (**liberação multivesicular**) como que o conteúdo dessas vesículas ativaria o mesmo grupo de transmissores (**transmitter pooling**). O significado funcional da liberação multivesicular seria uma não-linearidade da resposta sináptica, já que um aumento da  $p_r$  em uma situação de liberação univesicular levaria à ativação de mais receptores em diferentes zonas de liberação, enquanto que em uma situação de liberação multivesicular, teríamos mais vesículas sendo liberadas na mesma zona ativa, podendo levar a saturação dos receptores pós-sinápticos e conseqüentemente uma resposta menor do que obteríamos se tivéssemos liberação de duas vesículas em zonas ativas diferentes, além de podermos gerar uma depressão sináptica devido a uma desensibilização maior dos receptores (ver mais adiante).



## 6. Ação pós-sináptica dos transmissores.

Após a liberação dos transmissores na fenda sináptica eles se difundem pela fenda e uma fração desses transmissores entra em contato com seus receptores pós-sinápticos gerando, após sua ligação, a sua resposta biológica, a qual dependerá da natureza do receptor. Dois tipos gerais de receptores existem; (i) os receptores que geram as respostas rápidas de alteração de potencial da membrana celular pela abertura de canais iônicos, (receptores **ionotrópicos**), e (ii) os receptores que medeiam respostas lentas, como alterações lentas do potencial da membrana ou modulação da atividade de outras proteínas sinápticas ou a expressão de determinados genes, via produção de segundos mensageiros químicos (receptores **metabotrópicos**).

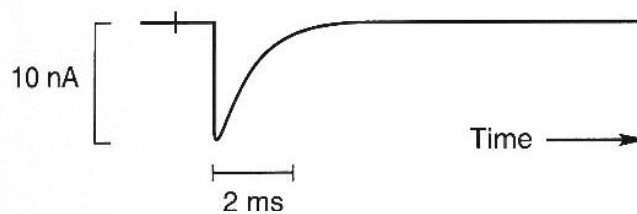
### 6.1. Receptores ionotrópicos e a neurotransmissão rápida – bases iônicas da excitação.

A neurotransmissão rápida é o motor do sistema nervoso. Ela gera dois tipos de respostas: (i) a **excitação**, ou seja, a despolarização do neurônio, um aumento do potencial de membrana para valores mais próximos ao limiar de geração do potencial de ação, e (ii) a **inibição**, ou seja, a hiperpolarização do neurônio, uma diminuição do potencial de membrana do neurônio para valores mais próximos do seu potencial de repouso ou a estabilização do potencial de repouso em resposta a um estímulo excitatório. Inibição e excitação é a linguagem usada pelos neurotransmissores para alterar a excitabilidade da célula pós-sináptica. A excitação tem o objetivo de levar o neurônio pós-sináptico a atingir o potencial limiar<sup>9</sup> para a geração de um potencial de ação que viajará até os terminais sinápticos desse neurônio. A inibição tem o objetivo de manter o potencial da membrana o mais próximo do seu potencial de repouso. Na junção neuromuscular e em certos neurônios que tem função de relé, ou seja, de passar a informação fielmente, a neurotransmissão é sempre excitatória e supralimiar (devido ao grande número de vesículas sinápticas liberadas por potencial de ação). Já na maioria dos neurônios centrais cada vesícula liberada produz um pequeno efeito sobre o potencial da membrana, que então é computado pela membrana pós-sináptica conjuntamente com todos os sinais inibitórios e excitatórios que chegam no tempo e no espaço, resultando em uma resposta final (disparar ou não um potencial de ação)

Os transmissores glutamato, GABA, glicina e acetilcolina são os principais transmissores rápidos que agem via receptores ionotrópicos. ATP e serotonina também possuem receptores ionotrópicos para eles, porém sua função é bem mais restrita, agindo principalmente via seus receptores metabotrópicos. Glutamato e acetilcolina são transmissores excitatórios. GABA e glicina são transmissores inibitórios, porém em certas circunstâncias veremos que podem ser também excitatórios. Seus principais receptores são ionotrópicos, ou seja, eles são canais iônicos ativados pela ligação desses ligantes. Na ausência dos transmissores esses canais tendem a permanecer em seu estado não permeante que chamamos de fechado (**C**). Após a ligação dos neurotransmissores (geralmente 2 são necessários para ativá-los) eles transitam para um estado permeante, aberto (**O**). Os transmissores se ligam aos seus receptores segundo a lei da ação das massas, e possuem uma constante de dissociação ( $K_d$ ). Quando a vesícula libera o seu conteúdo a concentração imediata de transmissor que o receptor vê é muito mais alta do que o  $K_d$  para o transmissor,

<sup>9</sup> Um potencial que se situa em torno de  $-50$  mV, dependendo de várias variáveis da membrana.

então logo os sítios de ligação do transmissor são ocupados e o canal muda da conformação C para a conformação O. O resultado disso é um fluxo iônico imediato que gera uma corrente através da membrana que podemos medir usando a técnica de *voltage-clamp* (figura 10). Essa fase de **ativação** rápida é precedida de um decaimento exponencial da corrente (figura 10). Esse decaimento é resultado de dois fatores: logo após os transmissores se ligarem aos seus receptores, a concentração de transmissores livres cai rapidamente devido à difusão dos transmissores pela fenda sináptica. Para auxiliar a retirada dos transmissores as membranas neuronais e gliais expressam **transportadores** específicos dos neurotransmissores. Essas moléculas possuem alta afinidade para os seus respectivos transmissores e usam o gradiente eletroquímico do sódio para realizar o transporte. A exceção é a acetilcolina, que é degradada pela enzima **acetilcolinaesterase** em colina e acetato. A colina então é recaptada pelos neurônios por um transportador específico.

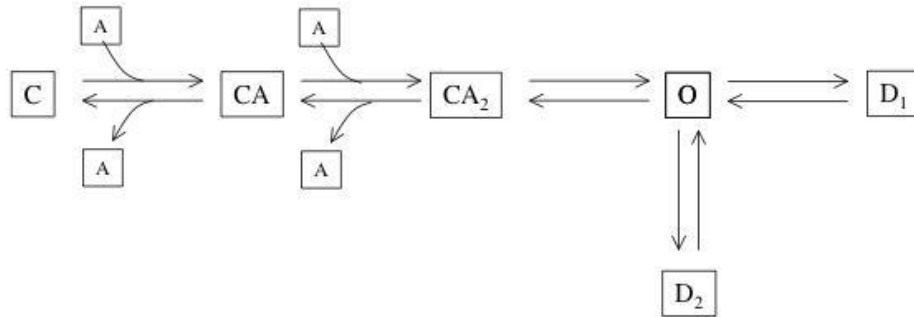


**Figura 10:** corrente pós-sináptica excitatória.

Com a queda rápida na concentração de transmissores ao redor dos receptores, eles tendem, também seguindo a lei da ação das massas, a se dissociar dos seus sítios retornando o receptor ao estado C. Temos então a **desativação** dos receptores.

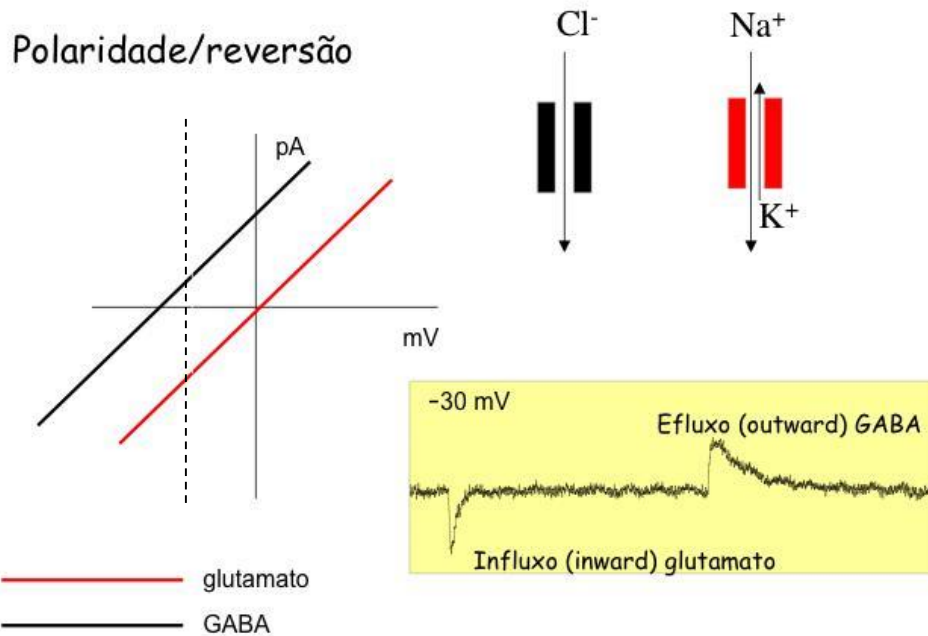
O outro fator contribuinte para o decaimento da corrente ocorre antes do transmissor se dissociar do seu sítio de ligação. A permanência do receptor ligado ao seu sítio por certo tempo pode levar a outra mudança conformacional do receptor que o leva para um estado não-condutor, mas ainda ligado ao transmissor, o estado **dessensibilizado (D)**. Nesse estado não só o canal se fecha não permeando íons, como o receptor fica refratário à ligação de transmissores já que os seus sítios de ligação estão ocupados. A dessensibilização é um fator importante para moldar o decaimento da resposta neuronal de certos receptores enquanto que a desativação modula mais fortemente a resposta neuronal de outros receptores. À medida que a concentração dos transmissores cai, o equilíbrio químico favorece o desligamento dos transmissores e a remoção da dessensibilização desses. Um esquema cinético de um receptor pode ser visto na figura 11.





**Figura 11:** modelo cinético simplificado do receptor ionotrópico de acetilcolina (nicotínico). A = acetilcolina. Cada seta possui uma respectiva constante cinética (k).

O que leva um transmissor ser excitatório ou inibitório? A resposta está na natureza do íon permeante ao receptor em particular. Transmissores excitatórios abrem canais que permeiam cátions (**catiônicos**), enquanto que receptores inibitórios abrem canais que permeiam ânions (**aniônicos**). Dos cátions fisiológicos que permeiam os canais catiônicos os mais permeantes são o sódio, o potássio e, em alguns tipos de receptores ionotrópicos, o cálcio. Cada íon se move seguindo o seu gradiente eletroquímico. Em um neurônio em repouso ( $\sim -70$  mV) e nas concentrações fisiológicas desses íons, a abertura de um desses canais leva ao influxo de sódio e de cálcio e ao efluxo de potássio. A corrente gerada será uma resultante da permeabilidade relativa de cada íon ao canal. Para a corrente gerada por esse canal seja excitatória ela deve promover um influxo líquido de cargas positivas (corrente negativa). Os canais catiônicos dos receptores para neurotransmissores possuem corrente negativa em potenciais negativos e positiva em potenciais positivos, ou seja, a corrente possui um **potencial de reversão** em 0 mV. Esse potencial de reversão é uma resultante dos potenciais de reversão dos diferentes íons permeantes. Já os canais aniônicos permeiam basicamente cloreto nas condições fisiológicas, e possuem então um potencial de reversão negativo, próximo do valor do potencial da membrana. muitas vezes iguais ao mesmo devido a distribuição passiva do cloreto na maioria as células (figura 12). Quando esses canais se abrem eles adicionam condutâncias na membrana e de acordo com a equação da condutância de corda eles tenderão a levar o potencial da membrana para próximo de seus potenciais de reversão. O resultado final é o balanço dos potenciais de reversão das correntes excitatórias, inibitórias e das outras correntes iônicas da membrana.



**Figura 12:** Relação corrente (pA) versus potencial da membrana (mV) de um canal aniônico (preto) e catiônico (vermelho) ativados por GABA e glutamato, respectivamente. A linha pontilhada representa o potencial de repouso da célula. Correntes com potencial de reversão positivo em relação ao potencial de repouso são excitatórias, enquanto que correntes com potencial de reversão negativo ao potencial de repouso são inibitórias. No inserto em amarelo temos um exemplo de registro de correntes glutamatérgicas excitatórias e GABAérgicas inibitórias em um mesmo neurônio granular do cerebelo.

É fácil perceber que o que define se um transmissor é excitatório ou inibitório é a natureza do íon permeante no seu receptor. E, além disso, as respectivas concentrações iônicas intra e extracelulares, já que de acordo com a equação de Nernst o equilíbrio eletroquímico de um íon depende dessas concentrações. Em condições fisiológicas as concentrações extracelulares nos líquidos extracelulares são mantidas constantes pelos sistemas de homeostase do organismo (o rim e os ossos, no caso do cálcio). As concentrações intracelulares também são mantidas constantes pelos transportadores de membrana. O principal deles, a Na/K ATPase, mantém o gradiente iônico desses dois íons acumulando o potássio intracelularmente e expulsando o sódio do citoplasma. O cálcio possui diversos sistemas de exclusão da sinapse, bem como proteínas que se ligam avidamente ao cálcio livre. Já o cloreto muitas vezes se distribui passivamente pelos compartimentos extra e intracelulares, por isso seu potencial de reversão é, nesses casos, próximo do repouso. Entretanto diversos neurônios podem expressar sistemas de transporte de cloreto que podem bombear ou expulsar cloreto do citoplasma. Neurônios imaturos muitas vezes expressam um transportador de cloreto que bombeia cloreto para o citoplasma à custa dos gradientes eletroquímicos do sódio e do potássio (NKCC1). Nesses neurônios a concentração intracelular de cloreto fica alta e seu potencial de reversão fica positivo em relação ao potencial de membrana. Assim, em neurônios imaturos a abertura de canais de cloreto gera despolarizações e os transmissores clássicos inibitórios GABA e glicina são, nessa situação, excitatórios. Quando amadurecem, esses neurônios deixam de expressar o NKCC1, e as concentrações de cloreto intracelular abaixam e a corrente que passa pelos canais aniônicos volta a reverter próximo do repouso e GABA e glicina passam a ser

inibitórios. Além disso, muitos neurônios expressam o trocador cloreto/potássio KCC2 que expulsa o cloreto do citoplasma, diminuindo seu potencial de reversão para mais abaixo ainda do potencial da membrana. É bom salientar que mesmo em neurônios adultos, ações excitatórias de GABA e glicina já foram identificadas. Mas de uma forma global GABA e glicina são transmissores inibitórios em neurônios do sistema nervoso central.

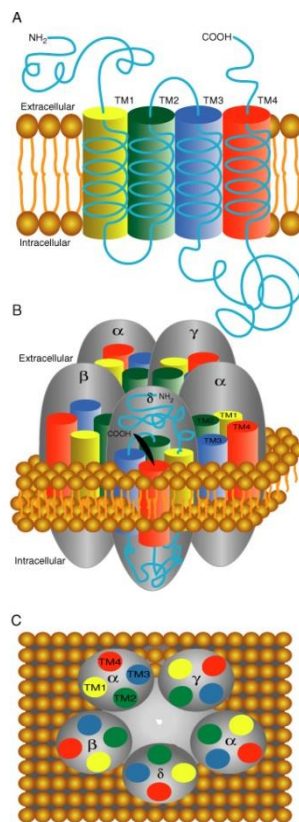
## 6.2. Variedade e farmacologia dos receptores ionotrópicos.

Receptores ionotrópicos são proteínas integrais de membrana pentaméricas ou teraméricas. Como normalmente existem diversas subunidades que podem compor o pentâmero ou tetrâmero, a variedade possível de receptores pode ser imensa, como é o caso dos receptores GABAérgicos. Mas farmacologicamente eles respondem de forma parecida a seus agonistas e antagonistas.

### 6.2.1. O receptor colinérgico.

O receptor ionotrópico que possuímos mais informações estruturais é o da acetilcolina, o receptor **nicotínico (nAChR;** o nome se deve ao principal **agonista** desse receptor, a **nicotina**). Isso por que o órgão elétrico da raia *Torpedo* é uma fonte prodigiosa desses receptores. O receptor nicotínico do órgão elétrico é um pentâmero composto da combinação de 4 subunidades diferentes ( $\alpha 2\beta\gamma\delta$ ), sendo cada subunidade composta de 4 segmentos transmembrana (TM1-TM4) (figura 13). O receptor possui dois sítios de ligação para a acetilcolina, localizados em suas subunidades alfa, sendo que a ligação da acetilcolina a esses sítios apresenta cooperatividade. A ligação das duas moléculas de acetilcolina leva a uma alteração conformacional rápida que leva à abertura do poro com uma constante cinética de 20  $\mu$ s. Essa alteração conformacional se deve basicamente a uma torção dos segmentos TM2 que relaxa um anel de leucinas que forma uma constrição ao redor do poro seletivo, além de expor a parede do canal uma série de aminoácidos polares que criam um caminho hidrofílico para os íons.

Uma vez nessa conformação o canal como já visto na figura 11 tem dois caminhos, ou a acetilcolina se desliga e ele volta ao estado fechado ou ele entra no estado dessensibilizado. O receptor nicotínico apresenta uma razoável dessensibilização que é dependente da concentração de acetilcolina (o que é óbvio, pois quanto maior a concentração de acetilcolina em relação ao seu  $K_d$ , mais tempo o canal ficará ocupado com acetilcolina e mais chances ele terá de cair no estado dessensibilizado). Os estados dessensibilizados (D1 e D2, ver figura 10) representam um “poço energético” já que a acetilcolina tem maior afinidade aos estados dessensibilizados do que ao estado aberto (aberto = 10  $\mu$ M; D1 = 1  $\mu$ M; D2 10 nM). Ou seja, quando o receptor entra no estado dessensibilizado mais tempo o receptor levará para se desligar das moléculas de acetilcolina. Além disso altas concentrações de acetilcolina tenderão a favorecer a entrada do receptor no estado dessensibilizado.



**Figura 13:** estrutura do receptor nicotínico.

Os receptores nicotínicos musculares de mamíferos são semelhantes aos receptores do órgão elétrico da raia, mas contém uma subunidade  $\epsilon$  ao invés da subunidade  $\gamma$ . Em embriões a subunidade  $\epsilon$  é substituída por uma subunidade  $\gamma$ -embrionária com características cinéticas distintas da subunidade  $\epsilon$ . Receptores centrais contêm apenas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  na proporção de 2:3. Existem 6 subtipos de subunidades alfa ( $\alpha$ 2-7) e 3 de beta ( $\beta$ 2-4) presentes em neurônios centrais (as subunidades  $\alpha$ 1 e  $\beta$ 1 são musculares e a  $\alpha$ 8 é específica para aves). As composições de subunidades presentes no sistema nervoso central não são exatamente conhecidas, mas experimentos recentes sugerem que a subunidade  $\beta$ 2 combinada com diferentes subunidades alfa está presente na maior parte dos receptores nicotínicos centrais. Receptores contendo essa subunidade devem estar envolvidos nos efeitos centrais da nicotina. Receptores nicotínicos centrais também são mais suscetíveis a dessensibilização do que os da placa motora. Fosforilação do receptor pela PKA também aumenta a taxa de dessensibilização. A dessensibilização não modela a forma da corrente sináptica da placa motora, mas pode afetar a duração das correntes nicotínicas centrais.

O receptor nicotínico não possui uma grande variedade de ligantes. O principal agonista do receptor nicotínico é o alcalóide nicotina. Experimentalmente as drogas, **epibatina** e **lobelina** são utilizadas como agonistas, porém suas afinidades diferem para diferentes tipos de combinações de subunidades. A **D-tubocurarina (curare)** é o antagonista competitivo clássico dos receptores nicotínicos. Além dela a  **$\alpha$ -bungarotoxina** é um bloqueador de alta afinidade do receptor nicotínico muscular e é usado como um marcador *in vivo* e *in vitro* desses receptores.

### 6.2.2. Os receptores glutamatergicos.

O aminoácido glutamato é o principal transmissor excitatório central. Basicamente todos os neurônios centrais recebem sinapses glutamatergicas, e então possuem receptores para o glutamato. Os receptores glutamatergicos também são compostos de combinações de diferentes subunidades, embora existam discussões sobre a estequiometria correta. Apesar de originalmente proposto como um pentâmero, recentes evidências fisiológicas propõe que ele seja um tetrâmero. Cada subunidade é composta de três segmentos transmembrana alfa-hélice (T1, T3 e T4), e um segmento que atravessa parcialmente a membrana formando a região do poro (T2). O sítio de ligação do glutamato é formado pela interação entre o domínio extracelular N-terminal e o segmento entre T3 e T4 (figura 14).

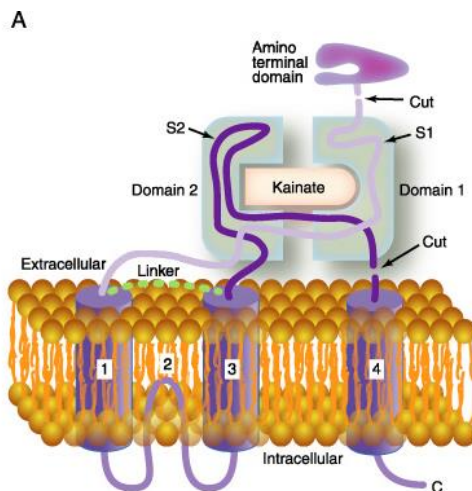


Figura 14: estrutura do receptor glutamatergico.

Os receptores glutamatergicos ionotrópicos podem ser divididos em três classes baseadas na sua farmacologia. Receptores de amino 3-hidroxi-5-metil isoxazol propionato (AMPA), de cainato e de N-metil-D-aspartato (NMDA). Receptores para AMPA e cainato são normalmente tratados como a mesma entidade (AMPA/cainato) já que biofísicamente são indistinguíveis e apenas recentemente antagonistas específicos para esses receptores foram desenvolvidos. Esses receptores também são tratados como receptores **não-NMDA**. Biofísicamente as correntes geradas por receptores AMPA/cainato e NMDA são muito distintas (figura 15), e esses receptores participam de diferentes respostas celulares. Receptores AMPA/cainato são os responsáveis pela geração dos potenciais pós-sinápticos excitatórios (EPSPs) centrais. Sua abertura gera um influxo catiônico forte que exibe pouca ou nenhuma **retificação**<sup>10</sup>, semelhante à corrente gerada pelos receptores nicotínicos. Suas cinéticas de ativação são bastante rápidas e eles dessensibilizam mais rápido do que desativam, sendo essa dessensibilização o fator principal na determinação do decaimento da corrente pós-sináptica.

Já os receptores NMDA possuem características biofísicas únicas, a saber.

<sup>10</sup> O fenômeno de retificação é quando um condutor conduz a corrente elétrica melhor em uma direção do que na outra. Em se tratando de canais isso significa que o canal conduz os íons melhor em uma direção, por exemplo, mais para fora do que para dentro (retificação para fora ou de saída). Veja na figura 15 o exemplo do receptor NMDA.

1. Eles apresentam uma forte retificação de saída na presença de magnésio extracelular.
2. Eles ativam e dessensibilizam muito mais lentamente do que os receptores AMPA/cainato.
3. Eles possuem uma permeabilidade ao cálcio grande, ao contrário da maioria dos receptores AMPA/cainato.
4. Eles precisam de dois ligantes para serem ativados, além do glutamato eles precisam se ligar à glicina, porém possuem um  $K_d$  para glicina muito baixo e a glicina presente no líquido extracelular é suficiente para manter o sítio de ligação para glicina ativado.

O significado fisiológico do co-agonismo da glicina é desconhecido, mas as outras três características explicariam a importância que esses receptores têm em processos de plasticidade sináptica, aprendizado e morte neuronal.

A retificação de saída significa que o receptor NMDA conduz melhor os íons para fora da célula do que para dentro. De fato a relação corrente-voltagem da ativação do receptor NMDA mostra que em potenciais em torno do repouso (-70 mV) ele praticamente não conduz corrente. O neurônio precisa estar despolarizado (>-40 mV) para o receptor começar a apresentar condutância. Isso se deve ao bloqueio que o íon magnésio exerce no receptor em potenciais negativos. Ele tende a entrar pelo canal, mas devido ao tamanho grande do íon hidratado em relação ao cálcio ele interage com a parede do canal e leva muito tempo para ser desidratado e poder passar pelo **filtro de seletividade**<sup>11</sup> do canal, gerando na prática um bloqueio. Em potenciais positivos esse bloqueio é aliviado e os íons que saem da célula pelo canal conseguem “empurrar” o magnésio para fora da boca do canal. Essa retificação implica que o receptor NMDA só pode conduzir quando o neurônio estiver despolarizado. Na prática isso quer dizer que a ligação do glutamato ao receptor NMDA no potencial de repouso não causa efeito significativo, mas se ao mesmo tempo o neurônio despolarizar, digamos devido à abertura de receptores AMPA/cainato, aí sim haverá fluxo pelo receptor NMDA<sup>12</sup>. Podemos dizer que o receptor NMDA então é um **detector de coincidência** ou um **associador**, já que o neurônio precisa receber uma excitação paralela de outra fonte para poder ativar a via que possui receptores NMDA.

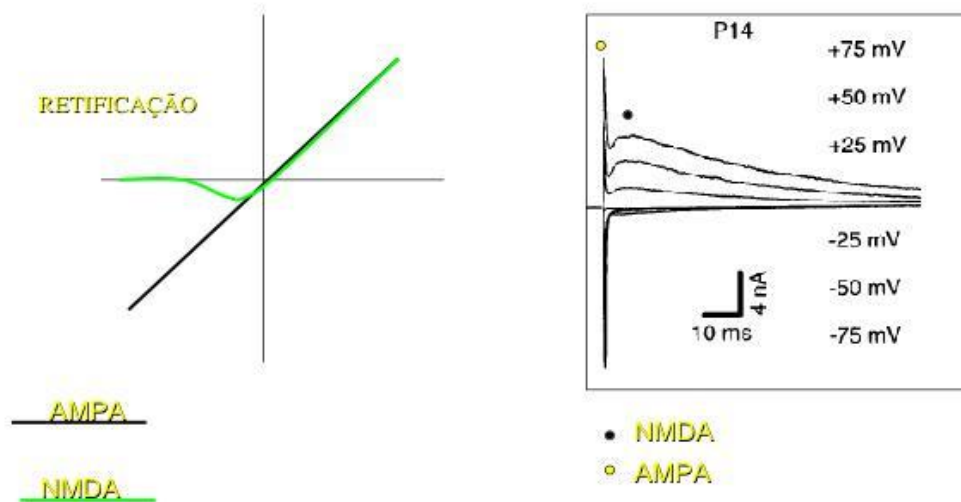
Qual seria então a consequência da ativação dos receptores NMDA? A alta permeabilidade ao cálcio desses receptores faz que ele seja a principal via pós-sináptica de entrada de cálcio, e esse cálcio é capaz de ativar diversas cascatas metabólicas que estão associadas com mudanças na fisiologia sináptica (como será visto mais tarde), ou seja, **plasticidade**. A cinética lenta de ativação desse receptor garante que apenas uma despolarização persistente pode ativá-los e sua cinética lenta de dessensibilização garante que seu efeito seja prolongado. O cálcio que entra pelos receptores NMDA além de ser um sinalizador importante para o fenômeno de plasticidade pode, em casos de liberação excessiva de glutamato como a que ocorre em um processo isquêmico, desencadear as

---

<sup>11</sup> Região do poro que confere a seletividade do canal a seus íons permeantes.

<sup>12</sup> Por isso é que sinapses glutamatérgicas que possuem apenas receptores NMDA são chamadas de “sinapses silenciosas”.

cascatas de morte celular levando à necrose ou apoptose neuronal. Processo esse chamado **exocitotoxicidade**.



**Figura 15:** diferenças nas correntes AMPA e NMDA. Na esquerda vemos a relação corrente-voltagem das correntes geradas pela ativação desses receptores, mostrando o fenômeno da retificação. Nos traçados da esquerda vemos correntes geradas pela estimulação da sinapse glutamatérgica do cálice de Held em diferentes potenciais. Note que a corrente NMDA só aparece em potenciais despolarizados e é mais lenta do que a corrente AMPA. Taschenberger e vonGersdorff, *J Neuroscience* 2000.

Na tabela abaixo temos as subunidades que formam os diferentes receptores glutamatérgicos ionotrópicos e seus respectivos agonistas e antagonistas. Além dessa variedade os receptores GluR1-4 (que formam os receptores AMPA) sofrem *splicing* alternativo gerando para cada gene duas variedades, uma *flip* e outra *flop*. As características biofísicas e farmacológicas de receptores contendo as versões *flip* ou *flop* dos mesmos genes são bastante distintas. Receptores AMPA que contêm a subunidade GluR2 permeiam muito pouco o cálcio, ao contrário dos receptores compostos de GluR1, 3 e/ou 4. Fica claro que existe uma variedade imensa de possíveis tipos funcionais de receptores AMPA. Muitas vezes as consequências funcionais dessa variedade são conhecidas, porém muito ainda não se sabe das consequências funcionais dessa variedade de receptores.

Tipo funcional	Subunidades	Agonistas	Antagonistas
AMPA	GluR1-4	Glutamato, AMPA	CNQX, DNQX, NBQX, GYK53466
Cainato	GluR3-7, KA1-2	Glutamato, Cainato	CNQX, DNQX, NBQX, UBP301
NMDA	NR1, NR2A-D	Glutamato, aspartato, NMDA	D-AP5, MK-801, cetamina, fenciclidina

**Tabela 2.** Receptores glutamatérgicos ionotrópicos, seus agonistas e antagonistas.

### 6.2.3. Os receptores GABAérgicos e glicinérgicos.

Receptores GABAérgicos e glicinérgicos formam canais permeáveis ao cloreto e com alguma permeabilidade também ao íon bicarbonato. Esses receptores são similares aos receptores nicotínicos, sendo pentâmeros e cada unidade possuindo 4 segmentos transmembrana. Os receptores GABAérgicos ionotrópicos (chamados de receptores **GABA<sub>A</sub>**) são compostos por combinações de 6 subunidades  $\alpha$ , 4 subunidades  $\beta$ , 1 subunidades  $\delta$ , 3 subunidades  $\gamma$  além de subunidades mais raras  $\epsilon$ ,  $\pi$  e  $\theta$ . Na retina os receptores GABAérgicos são compostos por apenas subunidades  $\rho$  e são denominados **GABA<sub>C</sub>**.

Entretanto *in vivo* sabe-se que existem fortes preferências para combinações específicas de receptores **GABA<sub>A</sub>** contendo pelo menos 2 subunidades  $\alpha$ , 1 ou 2  $\beta$  e 1 ou 2  $\gamma$ ,  $\pi$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ , ou  $\delta$ . Estudos moleculares indicam que existem 5 tipos básicos de combinações:  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ;  $\alpha 2\beta 3\gamma x$ ,  $\alpha 5\beta 3\gamma x$ ,  $\alpha 1\alpha 4\beta 2\delta$  e  $\alpha 1\alpha 6\beta 2\delta$ . A combinação mais comum encontrada no sistema nervoso central seria a  $\alpha 1\beta 2/3\gamma 2$ . A subunidade  $\alpha 6$  é tipicamente encontrada em neurônios cerebelares.

A farmacologia dos receptores **GABA<sub>A</sub>** é variada. Além do GABA, **muscimol** e **isovugacina** são também agonistas. O antagonista competitivo típico é a **bicuculina**, enquanto que a **picrotoxina** é um antagonista não competitivo. A **gabazina** é um antagonista competitivo hidrossolúvel que tem sido muito usado experimentalmente devido aos efeitos dos sais de bicuculina em bloquear os canais de potássio dependentes de cálcio. Os agonistas **benzodiazepínicos** como o **diazepan** (Vallium), o **flunitrazepan** (Rohypinol) e o não diazepínico **zolpiden** se ligam a um sítio específico e aumentam a afinidade do receptor ao GABA além de diminuírem a taxa de desativação do receptor, promovendo um aumento da corrente total. A ação das benzodiazepinas depende da presença da subunidade  $\gamma 2$  combinada com as subunidades  $\alpha 1-3$  ou 5. Receptores contendo as subunidades  $\alpha 4/6$  são insensíveis à ação de benzodiazepinas. Os **barbituratos** como o **pentobarbital** aumentam o tempo de abertura do receptor **GABA<sub>A</sub>** além de aumentarem também a afinidade ao GABA, porém eles se ligam ao um sítio distinto ao das benzodiazepinas. A ação dos barbituratos independe da combinação dos receptores. **Neuroesteróides** também têm ação semelhante aos barbituratos, sendo esse o mecanismo dos efeitos sedativos da **progesterona**. O **etanol** também tem efeitos similares aos benzodiazepínicos e aos barbituratos. O antibiótico **penicilina G** é um antagonista dos receptores **GABA<sub>A</sub>**.

Os receptores glicinérgicos estão basicamente concentrados na medula espinhal, onde são os principais receptores inibitórios, e no tronco cerebral. Como o receptor **GABA<sub>A</sub>**, o receptor glicinérgico é um pentâmero composto de subunidades  $\alpha$  sozinhas ou em combinação com uma ou duas subunidades  $\beta$ . Existem 4 tipos de subunidade  $\alpha$  e uma  $\beta$ , com diversas variedades de *splicing* ocorrendo. A farmacologia dos receptores glicinérgicos é limitada, sendo a **estriquinina** um potente antagonista específico desses receptores. A picrotoxina também bloqueia os receptores glicinérgicos.

### 6.3 os receptores metabotrópicos.

Os receptores metabotrópicos de neurotransmissores são basicamente da família dos receptores de 7 segmentos transmembrana ligados a **proteínas-G** (figura 16). Transmissores como noradrenalina (6 receptores **alfa** e 3 receptores **beta**), dopamina (**D<sub>1</sub>** a **D<sub>5</sub>**), adenosina (**A<sub>1-3</sub>**), histamina (**H<sub>1-3</sub>**) e canabinóides (**CB<sub>1-2</sub>**) atuam exclusivamente via



receptores metabotrópicos. A família de receptores de serotonina consiste de 7 tipos de receptores (**5HT<sub>1-7</sub>**) sendo um apenas ionotrópico (o **5-HT<sub>3</sub>**). A ação do ATP via seus receptores metabotrópicos (5 isoformas do receptor **P2Y**) é bem conhecida, mas ele possui 7 receptores ionotrópicos **P2X** identificados, mas cuja função fisiológica é menos conhecida. Já os transmissores clássicos que agem via receptores ionotrópicos (exceto a glicina) possuem receptores metabotrópicos. A acetilcolina age via receptores **muscarínicos (M1 a M5)**, o GABA age via receptores **GABA<sub>B</sub>**, o glutamato possui 8 receptores metabotrópicos (**mGluRs**) separados em 3 famílias (ver tabela).

Família	Receptores	Agonistas	Antagonistas
<b>Grupo I</b>	mGluR1, 5	IS,3R-ACPD;DHPG	AIDA, CBPG
<b>Grupo II</b>	mGluR2, 3	IS,3R-ACPD; DCG-IV; APDC;	EGLU;PCG-4; LY341495
<b>Grupo III</b>	mGluR4, 6, 7, 8	L-AP4; IS,3R-ACPD	MAP4; MPPG; CPPG

**Tabela 3:** a família dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos.

A família das proteínas G ligadas aos receptores metabotrópicos é dividida em 4 grandes famílias de acordo com suas subunidades alfa: Gi, Gs, Go e Gq<sup>13</sup>, e suas ações são resumidas na figura 16.

É proposto que os receptores ligados a proteínas G funcionem em dois estados: um inativo, que não interage com proteínas G e outro ativo, que interage. Na ausência de agonista o equilíbrio favorece o estado inativo, porém quando agonistas estão presentes eles mudam o equilíbrio para o lado do estado ativo. Uma vez nesse estado os receptores metabotrópicos interagem com a proteína G, ativando a subunidade  $\alpha$  da proteína G (promovendo sua ligação ao GTP) que se desligará das subunidades  $\beta\gamma$  e ativará ou inibirá suas moléculas alvo, como mostrado acima na figura 15. As subunidades  $\beta\gamma$  por sua vez também possuem moléculas alvo, podendo interagir diretamente com canais de cálcio inibindo-os ou ativando os canais de potássio ativados por proteínas G (**GIRKs**), além de ativar a fosfolipase C e agir em outros alvos.

<sup>13</sup> As proteínas G<sub>off</sub> são apenas encontradas no epitélio olfativo e se ligam aos receptores da grande variedade de moléculas odorantes

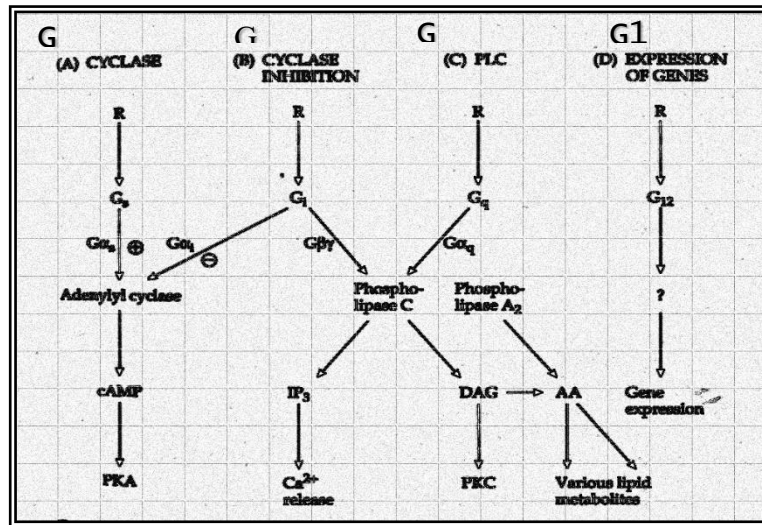
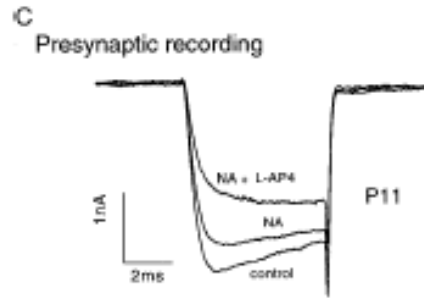


Figura 16: principais proteínas G ligadas a receptores metabotrópicos e seus mecanismos de ação.

Essa grande variedade de receptores e alvos das proteínas G cria uma grande diversidade de efeitos de um mesmo transmissor dependendo do tipo de receptor e de alvo molecular das proteínas G existentes no tecido-alvo. Assim é impossível definir uma função específica de receptores metabotrópicos. Eles podem desde modular rapidamente canais iônicos via interação da subunidade  $\beta\gamma$ , como alterar o citoesqueleto e a expressão gênica, alterando a fisiologia celular em longo prazo. A relevância fisiológica de transmissores que atuam exclusivamente via receptores metabotrópicos pode ser avaliada, por exemplo, pelos formidáveis efeitos da inibição da recaptação sináptica de noradrenalina, dopamina ou serotonina por drogas como **cocaína**, **MPMA**, **antidepressivos tricíclicos** e **anfetaminas**, que elevam a quantidade desses transmissores na fenda sináptica por muito tempo, ou dos efeitos psicotrópicos do **LSD**, um agonista serotoninérgico, e do  $\Delta_9$ -**tetrahydrocannabinol**, agonista canabinóide.

Entretanto um efeito dos receptores metabotrópicos é bem caracterizado e merece uma atenção especial. Terminais sinápticos possuem **autoreceptores** para os próprios transmissores que eles liberam. Esses autoreceptores são receptores metabotrópicos e se localizam em sítios extrasinápticos e tem a função de detectar um excesso de transmissores na fenda sináptica. Normalmente eles atuam via a interação da subunidade  $\beta\gamma$  com os canais de cálcio pré-sinápticos tornando-os mais refratários a entrarem ao estado aberto quando da despolarização da membrana, resultando em um menor influxo de cálcio pré-sináptico (figura 17) e conseqüentemente uma diminuição da  $p_r$  levando a uma diminuição na liberação de transmissores. Esses autoreceptores têm a função de auto-regular a liberação dos transmissores na sinapse.



**Figura 17:** inibição da corrente de cálcio pré-sináptica (-10 mV por 15 ms na sinapse gigante cálice de Held pela aplicação de noradrenalina (NA) e do agonista dos mGluRs III L-AP4. Coerentemente a inibição da liberação de glutamato por essa sinapse é maior pela aplicação de L-AP4 do que pela de NA. Leão e vonGersdorff, *J. Neurophysiology* 87, p.2297, 2002.

## 7. Plasticidade sináptica.

O termo **plasticidade neural** é bastante atrativo para a maioria das pessoas interessada no sistema nervoso. A existência de plasticidade no sistema nervoso significa que ele não se comporta de uma forma rígida, mas que se adapta de acordo com diferentes situações, o que faz sentido já que podemos aprender e memorizar informações e habilidades, então obviamente o sistema nervoso não pode funcionar de maneira rígida e estereotipada, mas de forma dinâmica se adaptando a diferentes demandas e necessidades.

Existem diferentes níveis de plasticidade. A que atrai a atenção da maior parte das pessoas, especialmente as leigas, e que vem à mente delas quando se defrontam com o termo plasticidade neural, é a capacidade de fibras nervosas danificadas se reconectarem ou de neurônios perdidos serem substituídos por novos neurônios a partir de células tronco neurais. Como o sistema nervoso central dos mamíferos adultos não expressa de forma expressiva esse tipo de plasticidade é compreensível o nível de excitação que o termo plasticidade gera no público em geral, pois resolver essa limitação que as células neurais têm de se regenerarem representaria um caminho para o alívio de diversas condições devastadoras geradas por acidentes vasculares cerebrais e secção da medula espinhal. E de fato diversos grupos se dedicam a tentar desvendar o caminho que faria um neurônio se dividir ou regenerar seus axônios cortados, um objetivo que ainda permanece distante.

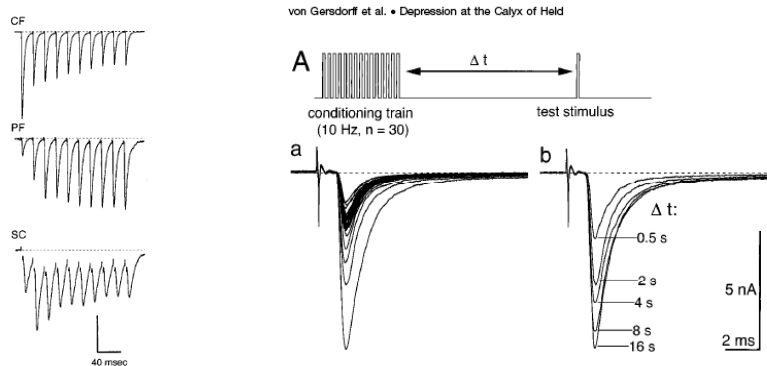
O sistema nervoso, entretanto altera continuamente sua função sem precisar recorrer a novos neurônios. A esse tipo de plasticidade fisiológica damos o nome de **plasticidade sináptica**. O que muda nesse tipo de plasticidade? A força da neurotransmissão seja na quantidade de neurotransmissores liberados e/ou na resposta dos receptores aos neurotransmissores. Ou seja, uma via sináptica pode ser reforçada ou enfraquecida em resposta ao nível de atividade que ela experimenta. Esse tipo de alteração na fisiologia sináptica é que deve estar envolvida nos processos de aprendizado e memória no sistema nervoso, além de contribuir para processos de habituação ou potenciação de vias neurais e outros processos que regulem a atividade de vias sinápticas em geral.

A plasticidade sináptica se manifesta por dois mecanismos: **facilitação** da transmissão (que pode receber os nomes de **potenciação** e **aumento**) e **depressão** da neurotransmissão. Podemos classificar os fenômenos de plasticidade sináptica em fenômenos de **curto prazo** e de **longo prazo**, dependendo do tempo de duração da plasticidade. Mecanismos de curto prazo duram de segundos a minutos, enquanto mecanismos de longo prazo levam de horas a dias, meses e, porque não, a vida toda?

### 7.1 plasticidade a curto prazo.

Se estivermos registrando eletrofisiologicamente a transmissão em uma sinapse específica vamos escolher uma taxa de estímulo baixa para registrarmos as correntes pós-sinápticas, digamos um estímulo a cada 30 segundos. Essa taxa de estimulação normalmente produz correntes sinápticas estáveis a cada pulso. Porém se decidirmos aumentar a taxa de estímulo, chegaremos a um ponto onde a amplitude das correntes sinápticas mudará, provavelmente aumente e em seguida diminua até um novo nível, ou apenas veremos um aumento ou uma depressão (figura 18). Se retornarmos ao protocolo inicial de 1 estímulo a cada 30 segundos, veremos um retorno à amplitude normal da corrente em alguns segundos ou minutos. Esses fenômenos são chamados de plasticidade a curto prazo exatamente por que são revertidos em segundos ou minutos.

Esses fenômenos de plasticidade sináptica a curto prazo são encontrados em todas as sinapses, pois são uma consequência da fisiologia das vesículas sinápticas e/ou das propriedades dos receptores pós-sinápticos. Os fenômenos de depressão e facilitação a curto prazo estão geralmente relacionados à probabilidade de liberação vesicular e ao tamanho do *pool* vesicular liberável. Sinapses com alta probabilidade de liberação vesicular tendem a liberar uma grande fração do *pool* vesicular por potencial de ação, sobrando poucas vesículas para serem liberadas se outro potencial de ação chegar antes do *pool* ser recomposto. Ou seja, temos uma diminuição do parâmetro  $n$ . Fatores que diminuem a probabilidade de liberação vesicular, como uma modulação negativa do canal de cálcio pré-sináptico por autoreceptores metabotrópicos, irão diminuir a amplitude da corrente sináptica, mas irão reduzir o tamanho da depressão. Porém se a concentração de transmissor liberada saturar os receptores pós-sinápticos poderemos também ter depressão por esses receptores ainda estarem ocupados por transmissores e dessensibilizados. Uma inativação dependente de cálcio das correntes de cálcio pré-sinápticas já foi observada e relacionada a depressão sináptica no cálice de Held, em resposta a longos períodos de estimulação a alta frequência.



**Figura 18:** à esquerda, exemplos de depressão, facilitação e facilitação seguida de depressão.. Direita: recuperação da depressão na sinapse cálice de Held. Note que a amplitude da corrente em b é maior de acordo com o tempo de espera após o estímulo de 10 Hz. CF=climbing fiber; PF=paralel fiber; SC=Schaffer colateral,

Já a facilitação da transmissão é um pouco mais complicada de explicar. A hipótese mais aceita, e da qual se tem evidências, seria que em situações de baixa frequência de estimulação teríamos tempo para os sistemas de extrusão de cálcio retornar o cálcio intrasináptico aos seus níveis basais. Já em uma situação de alta frequência de estimulação, os sistemas de extrusão de cálcio não teriam tempo suficiente entre um estímulo e outro para realizar o *clearance* completo do cálcio. O que acontece daí em diante é motivo de controvérsias. Esse cálcio residual teria um papel facilitador na liberação de vesículas, somando-se com o influxo de cálcio durante o potencial de ação e gerando um pico de cálcio ligeiramente maior o que aumentaria a probabilidade de liberação das vesículas. Porém esse modelo não é muito provável já que cálculos mostram que esse cálcio residual

acrescentaria pouco ao cálcio basal. Outro modelo seria a existência de um sensor de cálcio de maior afinidade do que a sinaptotagmina, mas com cinética lenta, que seria ativado pelo cálcio residual, e potencializaria a liberação de transmissores. Porém esse alvo molecular ao qual o cálcio residual se ligaria é desconhecido. O candidato mais provável seria a proteína cálcio-calmodulina cinase II, que fosforilaria a sinapsina e aumentaria a mobilização das vesículas para os seus sítios de ancoramento. Porém inibidores de calmodulina e inibidores ou mutantes na quinase não afetaram os processos de facilitação ou de potenciação (veja abaixo a diferença entre facilitação e potenciação). Um mecanismo que é plausível e já foi observado em condições experimentais de manipulação de tampões de cálcio pré-sinápticos no cálice de Held, seria a saturação das proteínas tamponantes de cálcio, o que levaria a um aumento do cálcio residual. Finalmente uma facilitação da corrente de cálcio pré-sináptica, por uma proteína sensora de cálcio, como a calmodulina, poderia contribuir com a facilitação a curto prazo.

A facilitação é rapidamente alcançada (em milissegundos) e também é rapidamente revertida, muitas vezes em menos de 1 segundo. Um processo de facilitação mais lenta que funcionaria na escala de alguns segundos é chamado de *augmentation* (aumento). Porém se aplicarmos trens de alta frequência muito duradouros (ou seqüências de trens) veremos um fenômeno mais persistente chamado de potenciação pós-tetânica (**PPT**) que pode durar vários minutos. A PPT é gerada por um acúmulo persistente do cálcio intrasináptico devido à saturação dos sistemas de *clearance* de cálcio, e pela liberação lenta de cálcio mitocondrial que foi captado durante o tétano. Alterações dependentes de atividade na duração dos potenciais de ação pré-sinápticos também podem aumentar o influxo de cálcio e contribuir com a PPT. Um sensor de cálcio distinto da sinaptotagmina também é proposto como um mecanismo de PPT pelo cálcio residual aumentado. Note que a mesma sinapse pode apresentar depressão e facilitação, e muitas vezes um fenômeno mascara o outro como pode ser visto na figura 19.

Os fenômenos de plasticidade sináptica a curto prazo não representam apenas um epifenômeno da fisiologia das sinapses, mas possui significados biológicos importantes, como habituação sensorial rápida, controle de ganho e seletividade direcional.

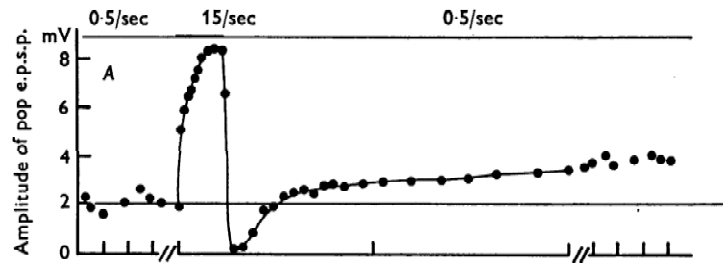
## 7.2 Plasticidade a longo prazo.

Os fenômenos de plasticidade a longo prazo são basicamente de dois tipos; a potenciação a longo prazo (*long-term potentiation-LTP*) e a depressão a longo prazo (*long-term depression-LTD*). Maior ênfase será dada aos mecanismos da LTP.

### 7.2.1 LTP.

A LTP foi primeiramente identificada em 1973 por Timothy Bliss e Terje Lomo. Eles demonstraram que em coelhos anestesiados, alta frequência de estimulação da via perforante do hipocampo levou a uma potenciação prolongada dos potenciais de campo extracelulares glutamatérgicos no giro denteado (figura 19). Entretanto os estudos sobre os mecanismos da LTP só foram investigados em detalhes aproximadamente 10 anos depois do trabalho clássico de Bliss e Lomo com o advento das técnicas de registro *in vitro* em fatias de hipocampo. A via mais estudada é a dos neurônios CA1 estimulados pelas vias Schaffer /comissural, e é dela que serão feitas referências normalmente, exceto quando indicado.

LTP é definido como um rápido, persistente e uso-dependente aumento nos potenciais ou correntes pós-sinápticas. Para a indução do LTP usa-se normalmente uma estimulação ou trens de estimulação de alta frequência (tétano) de 15-100 Hz por alguns segundos ou poucos minutos. É possível também gerar LTP com trens de atividade na frequência teta (5-10 Hz.) a chamada *theta-burst stimulation*, um protocolo mais próximo do que ocorre fisiologicamente no hipocampo.



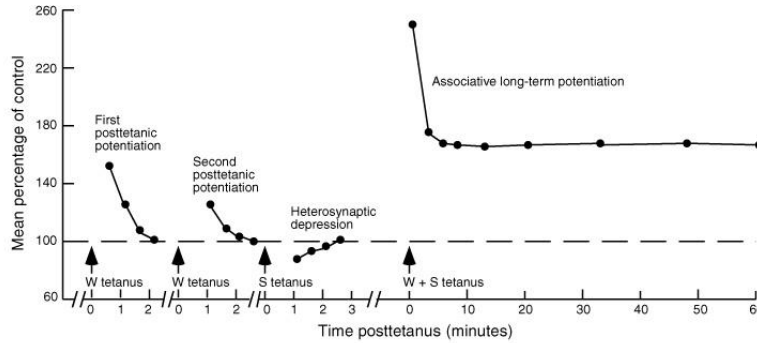
**Figura 19:** registro original de Blis e Lomo (*J Physiol* 232, p.331, 1973). Note a potenciação durante o tétano e que a LTP foi observada após um período de depressão sináptica.

O LTP tem três características básicas<sup>14</sup>: **cooperatividade**, **associatividade** e **especificidade** da via. A cooperatividade se refere ao fato de que a probabilidade de induzirmos o LTP aumenta com o número de fibras aferentes estimuladas. Ou seja, para induzirmos o LTP não basta estimular uma via com tétano, mas precisamos também usar um estímulo forte para recrutarmos o maior número de fibras aferentes possíveis. Um tétano fraco recrutará poucas vias que contribuirão pouco para a despolarização pós-sináptica necessária para a indução do LTP (ver abaixo).

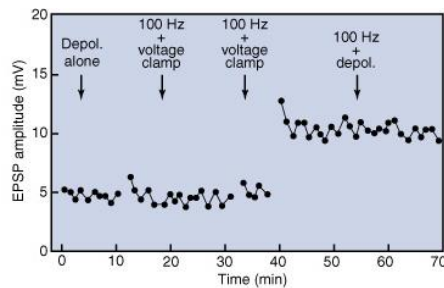
A associatividade é uma característica típica do que chamamos de **LTP associativo**, que é o presente na CA1 e em diversas outras áreas. O experimento clássico que demonstrou a associatividade mostra que registrando potenciais pós-sinápticos em um neurônio estimulando duas vias aferentes, uma com um estímulo fraco e outra com um estímulo forte, o LTP apenas se desenvolve na via fracamente estimulada quando essa via é estimulada em conjunto com a via forte (figura 20). A interpretação desse fato é que o neurônio pós-sináptico precisa estar despolarizado sincronicamente com a estimulação tetânica da via pré-sináptica para podermos gerar o LTP. Em experimentos onde o neurônio pós-sináptico é mantido em um potencial fixo por *voltage-clamp*, para gerarmos LTP na CA1 é preciso que despolarizemos o neurônio pós-sináptico ao mesmo tempo em que aplicamos o estímulo tetânico (figura 21). Esse protocolo é chamado de pareamento, e demonstra claramente que para gerarmos o LTP na CA1 precisamos que a via estimulada seja eficiente em despolarizar o neurônio pós-sináptico. Isso explica também o fenômeno de cooperatividade, já que a estimulação de muitas fibras aumenta a chance de despolarizarmos o neurônio pós-sináptico mais do que a estimulação de poucas fibras.

<sup>14</sup> Essas características embora básicas, não são universais. Podem existir formas de LTP em outras regiões além da CA1 que não atendam a algumas dessas características. Essas características são típicas do LTP associativo.

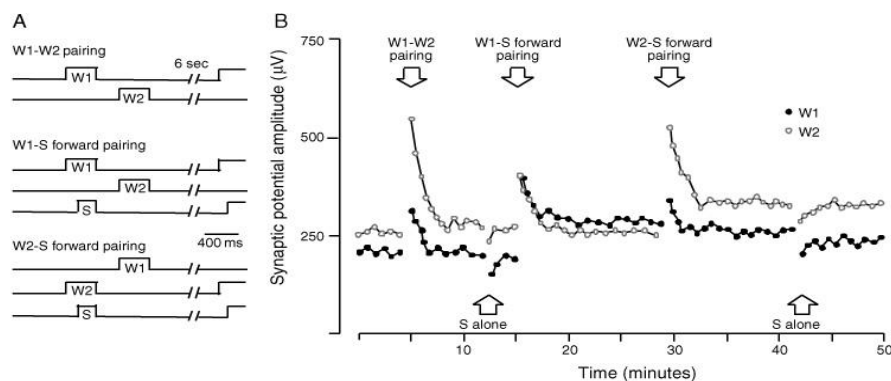
A especificidade da via pode ser demonstrada usando-se dois estímulos fracos e um forte, sendo que apenas uma das vias fracas é pareada com a estimulação forte. Observa-se que o LTP apenas se manifesta na via fraca (além da forte) que foi pareada com a estimulação forte. (Figura 22)



**Figura 20:** Demonstração do LTP associativo em CA1. W=via fraca; S=via forte. o gráfico mostra a resposta da via fraca a estímulos dados a 0,2 Hz. Barrionuevo e Brown, PNAS 80, p.7347, 1983.



**Figura 21:** demonstração do fenômeno do pareamento para gerar LTP em CA1 mantida em *voltage clamp*.



**Figura 22:** Demonstração da especificidade da via no LTP. Kelso e Brown, Science 232, p. 85. 1986.

Essas características do LTP o colocam como um atraente modelo para explicar fenômenos de memória e aprendizado. O psicólogo canadense Donald Hebb no final da década de 40 criou um postulado para explicar como um circuito sináptico poderia criar um mecanismo de memória: “Quando um axônio de uma célula A está próximo o suficiente



*para excitar a célula B e repetidamente ou persistentemente participa da geração de potenciais de ação da célula B, algum fator ou mudança metabólica ocorre em uma ou ambas as células aumentando a eficiência de A de gerar potenciais de ação em B*". O postulado de Hebb virou um paradigma para possíveis mecanismos sinápticos de formação de memória. O LTP é um fenômeno que possui as características de um fenômeno Hebbiano, como podemos ver nas figuras 20 a 22. Traduzindo o postulado de Hebb para uma visão mais contemporânea: "Neurônios que disparam em conjunto se conectam em conjunto" (*neurons that fire together, wire together*). Assim o LTP se tornou alvo de interesse de diversos grupos interessados nas bases fisiológicas do aprendizado.

Quais seriam os mecanismos moleculares da geração do LTP?

O LTP tem três fases: **indução**, **expressão** e **manutenção**. A fase da indução se refere aos processos iniciais que disparam os processos modificativos. A expressão representa os mecanismos que caracterizam o fenômeno de LTP, e a manutenção reflete processos mais amplos que preservam o LTP no longo prazo. Sabemos razoavelmente as bases moleculares da indução e da expressão, enquanto que os mecanismos de manutenção do LTP não estão claros.

A literatura em LTP é muito ampla e muito se publica sobre diferentes formas de indução de LTP e de diferentes proteínas que seriam importantes ou fundamentais para a indução do LTP. Muitas dessas evidências representam diferentes formas de indução do mesmo fenômeno, que pode ser expresso por diferentes protocolos de experimentação. Então é importante ter em mente que LTP mesmo no mesmo tipo celular pode ser gerado por diferentes protocolos. Porém todos têm uma via em comum que é a necessidade de haver, através da liberação de glutamato pré-sináptico um conseqüente aumento do **cálcio** pós-sináptico. O aumento do cálcio pós-sináptico é crucial para a indução do LTP em CA1 e em outras áreas. Tamponamento do cálcio pós sináptico com quelantes como o BAPTA inibe a indução do LTP. O cálcio pode vir de 3 vias: receptores NMDA, canais de cálcio sensíveis a voltagem pós-sinápticos e de estoques intracelulares via ativação por receptores metabotrópicos. Dessas três vias a mais importante e que explica os fenômenos de associatividade é via receptores NMDA. Antagonismo de receptores NMDA bloqueia a formação de LTP na via CA1/Schaffer comissural. O receptor NMDA tem características que explicariam as características do LTP. Primeiro ele só conduz quando o neurônio está despolarizado, de acordo com a associatividade do LTP. Segundo ele é bastante permeável ao cálcio, assim, quando o glutamato é liberado por uma sinapse e essa liberação despolariza suficientemente o neurônio via abertura de receptores AMPA, para os receptores NMDA poderem abrir e permear cálcio para o interior do neurônio o que desencadeia o processo de indução de LTP. É de se notar que devido à cinética mais lenta de ativação dos receptores NMDA é necessário uma despolarização mais longa para podermos iniciar a corrente pelo receptor NMDA, daí a necessidade do tétano.

Na via CA1/Schaffer comissural pode-se induzir LTP por formas independentes da ativação de receptores NMDA. Foi observado que um tétano de 25 Hz induz LTP dependente de NMDA enquanto que um tétano mais intenso de 200 Hz induz um LTP mais forte que constitui de LTP dependente de NMDA e um LTP dependente de canais de cálcio do tipo L, já que é bloqueado pelo bloqueador desses canais, nifedipina. Essa forma de LTP desenvolve-se mais lentamente e é mais persistente do que a dependente de NMDA. Além disso, a expressão dessa forma de LTP envolveria mecanismos distintos dos propostos para o LTP tradicional dependente de NMDA (veja abaixo). Também foi

demonstrado que o antagonismo de receptores metabotrópicos glutamatérgicos inibe a indução de LTP em CA1, mas em sinapses que não foram submetidas à estimulação de alta frequência anteriormente. mGluRs são encontrados pré e pós-sinápticamente e podem influir em ambos os lados a indução do LTP.

Os mecanismos de expressão de LTP podem ser pré e pós-sinápticos. Em comum esses mecanismos teriam o cálcio como indutor das modificações necessárias para termos o LTP. Na LTP dependente de NMDA dos sistema CA1/Schaffer comissural os mecanismos mais aceitos são pós-sinápticos (embora não se descarte o envolvimento de mecanismos pré-sinápticos). Está bem estabelecido que a fosforilação dos receptores AMPA pela calmodulina quinase II (**CAM/quinase II**) e talvez pela proteína quinase C (**PKC**) aumente a condutância desses receptores e isso seja a base para o aumento das correntes/potenciais sinápticos vistos no LTP. Tanto a CAM/quinase II como a PKC são dependentes de cálcio e fariam a ligação entre o influxo de cálcio e a expressão da LTP. Interessantemente a CAM/quinase II realiza autofosforilação, e nesse estado se mantém ativa mesmo após o declínio do cálcio citoplasmático. Animais mutantes para a CAM/quinase II nesse sítio de autofosforilação têm deficiência em expressar LTP.

Outro mecanismo seria a incorporação de novos receptores AMPA nas zonas pós-sinápticas. A incorporação de novos receptores AMPA (mas não NMDA) já foi observada em sinapses glutamatérgicas que expressaram LTP. Além disso, inibidores de tráfego de vesículas inibiram a indução de LTP em algumas preparações. Além de aumentar a condutância a glutamato de sinapses individuais existem evidências que o LTP aumente o número de sinapses pela incorporação de receptores AMPA nas chamadas **sinapses silenciosas**. Essas sinapses expressam apenas receptores NMDA e são chamadas silenciosas já que os receptores NMDA não são capazes de despolarizar a membrana a partir do repouso, então a liberação de glutamato nessas sinapses não gera nenhum efeito sobre o potencial da membrana. Foi observado que a ativação dessas sinapses por liberação de glutamato simultâneo com a depolarização pós-sináptica induz a incorporação de receptores AMPA nessas sinapses, aumentando assim o número de sinapses funcionais no neurônio.

A existência de mecanismos pré-sinápticos na LTP em CA1 são discutíveis. Em sinapses de invertebrados que expressam LTP, alterações de parâmetros pré-sinápticos, no caso um aumento no parâmetro  $m$ , são observados após a expressão de LTP. Em sinapses que expressam **LTP não-associativo**, ou seja, que não precisam de uma despolarização pós-sináptica simultânea para ocorrer, como nas sinapses entre as fibras musgosas e os neurônios CA3 do hipocampo e nas sinapses colinérgicas do gânglio cervical superior, um aumento no conteúdo quantal ( $m$ ) também é observado e possivelmente é o principal mecanismo de expressão de LTP nessas sinapses. Entretanto as evidências de alterações pré-sinápticas no LTP associativo da CA1 são conflitantes e pouco conclusivas. Nesse caso um efeito pré-sináptico envolveria a participação de um mensageiro retrógrado, possivelmente o óxido nítrico (NO), sendo liberado do soma neuronal para agir no botão sináptico aumentando a liberação de glutamato.

A manutenção do LTP por dias ou semanas (ou pela vida toda talvez) por sua vez depende de mecanismos adicionais, provavelmente ativação de novos genes e síntese protéica. Experimentos mostram que nas primeiras duas horas LTP é independente da síntese de novas proteínas, enquanto que a manutenção do LTP além dessas duas horas

depende da síntese protéica. O fator de transcrição CREB está provavelmente envolvido no processo de manutenção de LTP bem como na manutenção de memórias de longo prazo. Outro gene que parece estar envolvido na manutenção do LTP é o *Arc*, um gene induzido durante o LTP que produz uma proteína que interage com o citoesqueleto cujo mRNA é encontrado em sinapses que sofreram LTP. Um problema relacionado com a manutenção do LTP é como um sinal de uma sinapse específica viaja do dendrito até o núcleo e induz a expressão de um produto gênico que é direcionado especificamente para a sinapse potenciada (lembre-se da especificidade da via do LTP)? É proposto que de alguma forma essas sinapses estejam “marcadas” molecularmente (*tags*) e isso guiaria esses produtos gênicos até elas. Recentemente foi demonstrado que uma proteína quinase C não usual, a PKMzeta (PKM $\zeta$ ) é necessária para a manutenção da LTP mas não para sua indução. Mais interessante foi a demonstração que essa isoforma é necessária para a manutenção de memórias adquiridas um dia antes da injeção do inibidor da PKMzeta no hipocampo em ratos que passaram por testes de rejeição de local (*place avoidance*)

Quais as evidências da participação do LTP na formação de memórias e nos processos de aprendizado? As principais evidências são que processos de aprendizado e memória são perturbados por antagonistas que inibem a expressão de LTP, em especial a de antagonistas de receptores NMDA. Uma das evidências mais interessantes é a de camundongos que expressam uma deleção dos receptores NMDA da região CA1 que se expressava após a terceira semana pós-natal. Esses animais apresentam um desempenho significativamente inferior em testes de memória espacial, bem como o disparo das células CA1 que reconheciam certas regiões espaciais não ocorria de forma correlacionada como nos animais controle. Mais interessante ainda é um camundongo que super-expressava a subunidade NR2B do receptores NMDA. Esse animal apresentou desempenho superior aos controles nos testes de memória espacial e em outros testes comportamentais.

Apesar das diversas evidências farmacológicas e comportamentais da participação de mecanismos comuns a formação de LTP com os envolvidos no processo de aprendizado e memória, não existiam até pouco tempo evidências causais diretas entre LTP e formação de memória no hipocampo. A melhor evidência do gênero vinha de experimentos de condicionamento aversivo (*fear conditioning*) e medidas simultâneas de formação de LTP em neurônios da amígdala. Nessa área foi observada a indução de LTP na amígdala concomitantemente à indução do condicionamento aversivo. Entretanto recentemente foi mostrada uma conexão direta entre LTP em CA1 e aprendizado. Em um trabalho onde ratos foram treinados em um protocolo de esquiva inibitória e tiveram os potenciais de campo registrados por um *array* de 8 eletrodos na região CA1, LTP foi expresso em uma fração dos potenciais registrados, o que não foi observado nos ratos controle. Além do mais houve uma maior fosforilação do receptor AMPA hipocampal desses animais como uma maior expressão das subunidades GluR1 e GluR2 no hipocampo de ratos treinados em relação aos controles. Essas (e a evidência da participação do LTP na manutenção das memórias anterógradas descrita anteriormente) são as melhores evidências da participação de LTP em processos de aprendizado e memória.

### 7.2.2. LTD.

Pelo modelo Hebbiano eventualmente todas as sinapses em uso entrariam em algum tipo de processo de potenciação e que em algum momento todas as sinapses estariam expressando LTP, saturando o sistema. Pelos modelos matemáticos de plasticidade era

necessário adicionar um processo que revertesse o LTP ou que o contrabalançasse. A descoberta que fenômenos de depressão a longo prazo (LTD) também ocorriam no sistema nervoso central criou uma solução fisiológica à esse paradigma.

LTD, como a LTP, existe em diversas sinapses. No hipocampo LTD também requer a entrada de cálcio, porém é desencadeada por estímulos de **baixa** frequência ao contrário da LTP que depende de estímulos de alta frequência. Enquanto a LTP pode ser induzida no hipocampo por tétanos breves (como 4 trens de 10 estímulos a 100Hz.), a LTD necessita de uma estimulação de baixa frequência mais duradoura (900 estímulos a 1Hz. o que dá 15 minutos de estimulação). Como ambas as formas de plasticidade dependem da entrada de cálcio, em algum ponto as cascatas de sinalização divergem. Note também que esse tipo de LTD é **homosináptico**, ou seja, não é necessário haver a excitação de uma via forte que despolarize fortemente o neurônio pós sináptico para que ela ocorra. A fonte de cálcio para o LTD pode ser o receptor NMDA, embora exista LTD hipocampal independente da ativação de receptores NMDA.

Várias evidências suportam um modelo onde a quantidade de cálcio que entra nos dendritos pós-sinápticos regularia o caminho a ser tomado entre LTP e LTD. Aumentos grandes no cálcio pós-sináptico favoreceriam a ativação da CAM/quinase II levando ao LTP. Porém um aumento de cálcio menor levaria a ativação da proteína fosfatase IIB (**calcineurina**) que desfosforilaria o fator inibitório I (**II**). Essa proteína na forma fosforilada é um inibidor da proteína fosfatase I (**PP1**) e assim desinibiria a PP1, que desfosforilaria o receptor AMPA, além de desfosforilar a própria CAM/quinase II tornando-a inativa em condições baixas de cálcio. Interessantemente, a afinidade da calcineurina pelo cálcio é maior do que a CAM/quinase II, o que a levaria a ser ativada por pequenos influxos de cálcio. Além disso, é sabido que a proteína quinase dependente de cAMP (**PKA**) é ativada durante LTP (provavelmente pela ativação da adenilato ciclase por CAM e cálcio) e que fosforilaria a II e inibiria a PP1, inibindo a desfosforilação do receptor AMPA ativada pela LTP. Existem evidências também que a LTD aumente a endocitose dos receptores AMPA em neurônios hipocámpais em cultura. Então, temos dois mecanismos antagônicos que podem ser ativados dependendo do estado de atividade da sinapse. O interessante é que a LTD na CA1 pode ser feita para desinibir a LTP, mas também existem evidências que ela pode causar depressão em sinapses que não estão em LTP.

LTD ocorre também em outras regiões do sistema nervoso central. A LTD mais estudada é a cerebelar envolvendo as sinapses das fibras paralelas na árvore dendrítica da célula de Purkinje (**PF-PC LTD**). Diferentemente da LTD da CA1 essa forma de LTD é **heterosináptica** (associativa), já que necessita da ativação seqüencial das fibras paralelas (que vêm dos neurônios granulares) e da fibra trepadeira (*climbing fiber*), e necessita da ativação de mGluR1, NO e da liberação de endocanabinóides, mas não de receptores NMDA (que são ausentes das PCs). O sítio de ação da PF-PC LTD é pós sináptico e postula-se que induza a fosforilação do receptor AMPA das PCs em seu domínio C-terminal, levando a endocitose desses receptores. É proposto que a PF-PC LTD esteja envolvida nos processos de aprendizado motor.

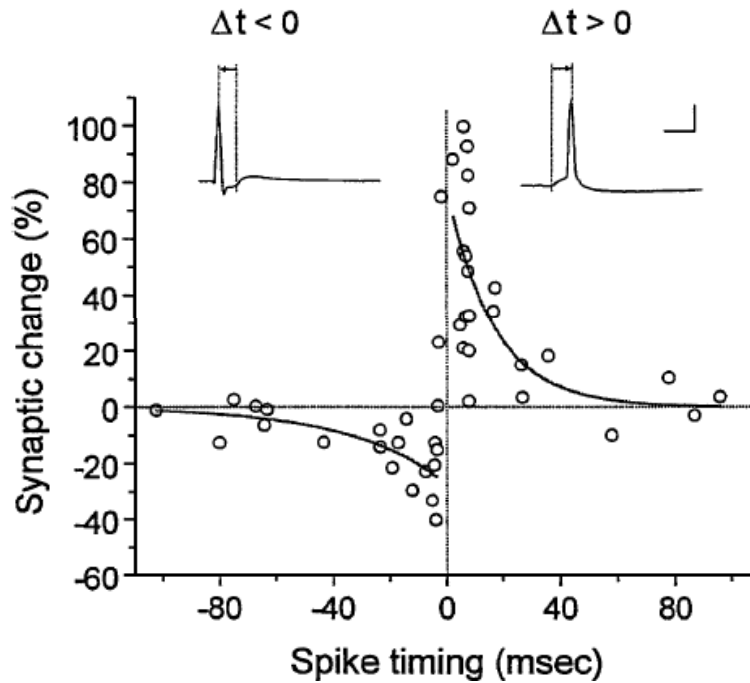
É bom ter em mente que a LTP e LTD vão além dos exemplos aqui citados, ocorrendo em diversas sinapses, tanto glutamatérgicas como GABAérgicas, e usando distintos mecanismos. Esse é um dos mais vastos assuntos da fisiologia sináptica e

certamente um dos mais excitantes atraindo a atenção de diversos neurocientistas em todo o mundo.

### 7.2.3. LTP/LTD dependente do tempo de *spike*.

Uma outra forma de plasticidade a longo prazo Hebbiana é a *spike-timing dependent plasticity* (STDP). Nesse tipo de plasticidade tanto LTP quanto LTD podem ser induzidos dependendo da ordem em que a corrente pós-sináptica e o potencial de ação pós-sináptico ocorram (figura 23). Para entender melhor o significado fisiológico dessa necessidade é preciso entender que os contatos sinápticos ocorrem nos dendritos, muitas vezes distantes do corpo celular. As correntes sinápticas excitatórias irão viajar através dos dendritos até o soma onde serão integradas com todas as correntes sinápticas que foram recebidas naquele tempo e se o potencial resultante for maior do que o limiar de geração do potencial de ação, um potencial de ação (*spike*) será gerado. Entretanto o potencial de ação além de viajar pelo axônio, irá se propagar retrogradamente até os dendritos. A chegada de um potencial de ação logo após a geração de uma corrente sináptica significaria que ela foi importante para levar o neurônio a decidir disparar um potencial de ação. Ao contrário se o *spike* chegar antes da corrente sináptica, isso significaria que aquela sinapse não está contribuindo para o disparo do potencial de ação, digamos que ela “meio que chegou tarde”.

Esse fenômeno foi primeiro observado que em sinapses entre a via perforante do córtex entorrinal e o giro denteado no hipocampo. Observou-se que para se gerar o LTP associativo não era necessário a perfeita sincronia entre o estímulo fraco e o forte. LTP poderia ser gerada se o estímulo forte fosse dado junto ou até 20 ms após o estímulo fraco. Entretanto se a ordem temporal era invertida a LTD era induzida ao invés da LTP. Outros experimentos feitos em neurônios corticais conectados mostraram que a LTP só era induzida quando um *spike* era induzido por injeção de corrente até 10 ms após o estímulo pré-sináptico induzia-se LTP, mas quando a ordem era invertida se induzia LTD. Um gráfico da temporalidade desse fenômeno pode ser visto na figura 23 onde diferentes protocolos de *timing* foram feitos em neurônios hipocampais em cultura. Pode-se apreciar a existência de uma janela temporal para a indução de plasticidade dependente de tempo de *spike*, e da abrupta mudança de LTD para LTP.



**Figura 23:** Dependência de tempo de *spike* para a geração de LTP ou LTD em neurônios hipocámpais em cultura. Bi e Poo, *J Neuroscience* 1998.

Em hipocampo, ambas as formas de LTP e LTD dependentes de tempo de *spike* dependem da ativação de receptores NMDA. É proposto que quando o potencial de ação é posterior à corrente sináptica isso gera um influxo maior de cálcio que favorece o LTP, enquanto que o *spike* anterior a corrente sináptica gera um aumento menor de cálcio que favorece o LTD.

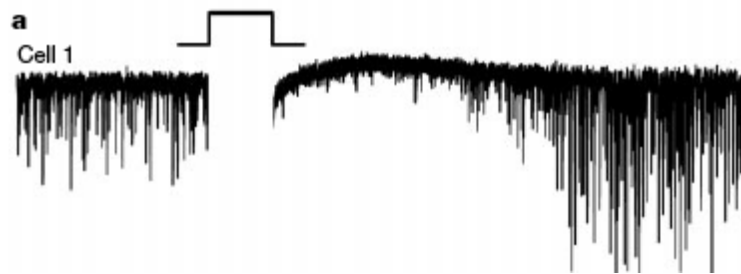
Esse tipo de plasticidade ocorre em diversas outras regiões do sistema nervoso e representa um *switch* rápido entre LTP e LTD usando um parâmetro mais fisiológico, o *spike* retrógrado, que indicaria ao neurônio se aquela via foi eficiente em ajudar com a computação neural. Curiosamente no cerebelo do peixe elétrico a relação de polaridade é inversa, com LTP sendo gerado pelo potencial de ação precedendo a corrente sináptica e LTD sendo gerado quando o *spike* chega junto ou depois da corrente sináptica.

### 7.3 *Depolarization suppression of inhibition (DSI)* e outras formas de plasticidade induzidas retrogradamente por endocanabinóides.

Um fenômeno de plasticidade a curto prazo observado no hipocampo que intrigou neurocientistas por muito tempo foi demonstrado existir em diversas partes do sistema nervoso central e irá merecer destaque aqui por usar um mecanismo que vem se mostrando muito comum em diversas sinapses, a neurotransmissão retrógrada.

A supressão da inibição pela despolarização (*Depolarization suppression of inhibition* ou DSI) é um fenômeno que foi primeiramente observado na região CA1 do hipocampo. Foi observado que a neurotransmissão espontânea GABAérgica era inibida por uma despolarização da célula pós-sináptica por alguns segundos (figura 24). Esse

fenômeno é dependente da entrada de cálcio e significaria a necessidade de uma comunicação entre o neurônio pós-sináptico e o terminal pré-sináptico. Posteriormente à substância que fazia essa ponte foi identificada como sendo um endocanabinóide provavelmente o **2-araquinoil glicerol (2AG)**; o outro endocanabinóide conhecido é a **anandamida**) que seria produzido e liberado pelo neurônio pós-sináptico em resposta ao aumento do cálcio e viajaria até as sinapses GABAérgicas onde interagiria com os receptores CB1 pré-sinápticos que reduziriam as correntes de cálcio pré-sinápticas reduzindo assim a neurotransmissão GABAérgica. No hipocampo é postulado que o DSI seria uma maneira de desinibir uma via sob forte estimulação, o que facilitaria a formação de LTP, e conseqüentemente de memórias (imagina-se que os efeitos do abuso de canabinóides afetem a memória por desinibirem tonicamemente o hipocampo, prejudicando qualquer padrão de informação existente no hipocampo).



**Figura 24:** demonstração do DSI em neurônios CA1 do hipocampo. Cada traço representa uma corrente pós-sináptica GABAérgica. Wilson e Nicoll, *Nature* 2000.

Posteriormente, fenômenos semelhantes envolvendo canabinóides foram identificados em outras regiões e mesmo com a transmissão glutamatérgica (o **DSE**, ou **depolarization supression of excitation**). Nas sinapses glutamatérgicas foi-se observado também uma ligação entre os receptores mGluR1 e os endocanabinóides. Observou-se que a ativação dos receptores mGluR1 pós-sinápticos induz a liberação de cálcio dos estoques intracelulares levando à produção e liberação de endocanabinóides que inibirão retrogradamente a liberação de glutamato via a ativação de receptores CB1 pré-sinápticos. Temos assim uma interação única ente dois transmissores na regulação da transmissão glutamatérgica. Cada vez mais fenômenos semelhantes envolvendo a ativação de receptores canabinóides são reportados no sistema nervoso central o que tornou o sistema canabinóide um dos mais intensamente explorados por pesquisadores interessados na modulação da neurotransmissão e na descoberta de novos alvos terapêuticos para drogas com efeitos sobre o sistema nervoso central.