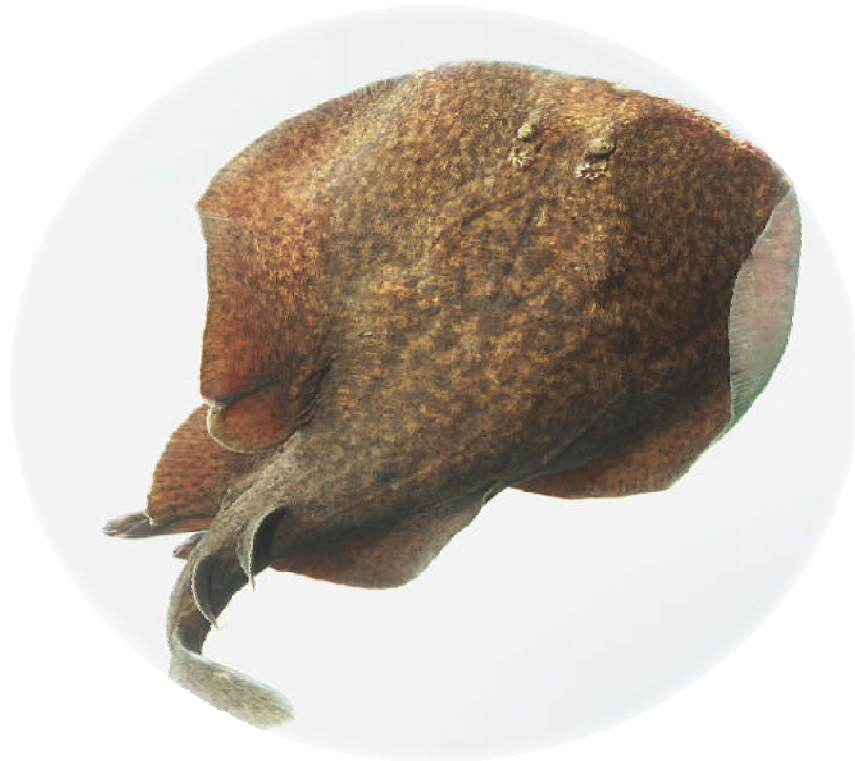




UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DO MAR E DO AMBIENTE

**Modulação da transmissão colinérgica no
órgão eléctrico de *Torpedo marmorata*
(Risso, 1810)**



Dissertação de Mestrado em Biologia Marinha
(Especialização em Biotecnologia Marinha)

Alexandra Carvalho Alves

Faro
2009

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DO MAR E DO AMBIENTE

**Modulação da transmissão colinérgica no
órgão eléctrico de *Torpedo marmorata*
(Risso, 1810)**

Dissertação de Mestrado em Biologia Marinha
(Especialização em Biotecnologia Marinha)

Nome: Alexandra Carvalho Alves

Orientadores: Doutor João Miguel da Silva Cordeiro
Professor Doutor Adelino Canário

Estágio realizado no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia
– Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB) –
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto (ICBAS-UP)

Faro
2009

O trabalho apresentado é da exclusiva responsabilidade do autor,

Alexandra Carvalho Alves

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá, por me ter aceite e acolhido no laboratório e, assim, ter contribuído para o meu desenvolvimento académico e para o aumento do meu conhecimento científico.

Ao Doutor J. Miguel Cordeiro, por ser meu orientador, pela paciência, apoio incondicional, supervisão, conselhos e pela passagem de conhecimentos importantes e essenciais.

Ao Professor Doutor Adelino Canário pela co-orientação e disponibilidade demonstradas sempre que necessário.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projecto.

Agradeço também à instituição acolhedora do projecto, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS).

Às tremelgas por se terem sacrificado involuntariamente em nome do avanço da Ciência.

A todos os que contribuíram para a captura dos indivíduos, em especial aos mestres de embarcação das docas do Algarve e da Póvoa.

Ao Doutor João Sendão sem o qual não teria sido possível a manutenção das tremelgas e parentes próximos em cativeiro (no PRODEP) e a realização de transporte dos espécimes. Por se ter levantado às 5 da manhã para me aturar, e por me tirar todas as dúvidas.

Ao Bruno Ramos pela ajuda essencial, disponibilidade e boa disposição. E ter-me auxiliado na manutenção destes espécimes em cativeiro (Engenharia Aquática-ICBAS).

Queria agradecer a todos os Doutores do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia, que estiveram sempre disponíveis para aumentar as minhas competências profissionais e que directa e indirectamente me acompanharam na execução do projecto (Dr^a Margarida, Dr^a Patricia, Dr^a Alexandrina, Dr^a Graça, Dr^a Teresa, Dr. Miguel Faria, Dr^a Fátima e Dr^a Adelina).

A todos os elementos do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia que contribuíram para a minha integração no grupo (Tisha, Diogo, Isabel, Cátia, Alda, Ana Rita, Zé, Bernardo, Luís, Ricardo, D. Helena e às novas aquisições), em especial à Cristina pela extrema boa disposição, pelo auxílio nos meus ataques de nervos e pela amizade que foi demonstrando no decorrer destes meses. E à D. Belmira por ser alma do laboratório, pela ajuda preciosa no dia-a-dia e pelos preciosos ensinamentos de vida.

A todos os que me ajudaram a chegar aonde estou hoje: Rita, Troglo, Trombone, Pipa, Moka, Flor, Vera, Pintas, Exbroxia, Ratonito, pGem, Angela, Dii, Extralabert, Débora, ao resto do Ano Fantástico, à Gang, ao Hugo, aos *encaminhadores de raias para a morte* (King e Samurai), aos novos idealistas (Éepa, Catarina, Joana, Fluffly, Roxy, Di) e aos mais velhos.

Em especial à Raquel, por ser a pessoa que é (amiga incondicional e defensora dos direitos dos animais) e fazer os sacrifícios que faz (ir me buscar ao laboratório às 2h da manhã, por exemplo).

E por fim, não posso deixar de agradecer à minha família que me acompanhou ao longo destes 24 anos: Mãe, Luna, Bia, Tia Helena, Mino, Avô Zé, Avó Alice e Pai.

Resumo

Este estudo incidiu nos mecanismos envolvidos na modulação da transmissão colinérgica por receptores nicotínicos (nAChR) pré-sinápticos. Neste trabalho, utilizaram-se os electróitos do órgão eléctrico de *Torpedo marmorata*, como detectores de libertação de ACh em tempo real através da medição de potenciais de electroplaca (EPP) numa pilha de electróitos sobrepostos (prisma). Estes potenciais resultam da libertação síncrona de ACh a partir de uma miríade de sinapses e possibilitam estudos sobre a neuromodulação nicotínica com uma resolução de milisegundos.

Para tal, avaliou-se o efeito da aplicação do agonista dos nAChR, iodeto de 1,1-dimetil-4-fenilpiperazínio (DMPP), durante 5 s sobre os potenciais eléctricos dos prismas. A presença de DMPP aumentou a amplitude (~ 20%) e a área (~ 37%) dos EPP, sendo este aumento dependente da concentração de agonista (n=10). O efeito facilitatório do DMPP (0,1-10 μM) na amplitude e na área dos prismas aumentou com a redução da concentração extracelular de Ca^{2+} de 3,4 mM (concentração fisiológica normal) para 1,7, 1,275 e 0,85 mM. Os resultados obtidos quando se avaliou a razão área/pico e latência demonstraram que os parâmetros relacionados com o tempo do sinal foram menos sensíveis à diminuição do Ca^{2+} extracelular. O efeito facilitatório da ACh libertada endogenamente foi prevenido na presença dos antagonistas nicotínicos, di-hidro-beta-eritroidina (DH- β -E) e hexametónio (HE). Estes resultados mostram que a acetilcolina (ACh) aumenta a sua própria libertação através da activação de nAChR. Este mecanismo pode funcionar como um amplificador pré-sináptico, aumentando a margem de segurança da transmissão sináptica, semelhante ao que foi observado na junção neuromuscular do rato (Faria *et al.*, 2003).

Para avaliar se as respostas eléctricas dos prismas ao DMPP teriam origem pré ou pós-sináptica, bloqueou-se a condução do impulso nervoso com TTX (1 μM) e inibiu-se a actividade da acetilcolinesterase (AChE) com neostigmina (20 μM). Nestas circunstâncias, a aplicação de ACh (100 μM) produziu potenciais pós-sinápticos superiores a 100 mV durante alguns segundos, ao contrário do que se observou após a aplicação de DMPP (100 μM) (n=4). Os resultados mostram claramente que o DMPP actua pré-sinápticamente facilitando a libertação de ACh, e que a sua actividade pós-sináptica é negligenciável. Para confirmar esta hipótese, realizaram-se ensaios com terminais nervosos isolados (sinaptossomas) do órgão eléctrico de *Torpedo*, onde foi possível medir directamente a libertação de ACh através de um método de quimioluminescência. Nestas circunstâncias, o DMPP aumentou a libertação de ACh (~ 30%) induzida através da despolarização dos sinaptossomas com veratridina (100 μM) ou KCl (40 mM), confirmando a natureza pré-sináptica da acção do DMPP. À semelhança do que se observou nas experiências electrofisiológicas com os prismas de *Torpedo*, o efeito facilitatório do DMPP nos sinaptossomas foi prevenido pela DH- β -E (3 μM), um antagonista dos nAChR contendo sub-unidades $\alpha 3/4\beta 2$ dos nAChR.

A relação espacial entre os nAChR e as zonas activas de libertação de ACh foi avaliada electrofisiologicamente usando os quelantes de Ca^{2+} BAPTA-AM e EGTA-AM. Esta metodologia, demonstrou a influência dos microdomínios de Ca^{2+} na modulação da libertação de ACh pelos nAChR pré-sinápticos. Os sensores de Ca^{2+} (da libertação de ACh) aparentam não estar co-localizados com os nAChR.

Este trabalho constitui a primeira tentativa, de que se tem conhecimento, para avaliar o papel dos autoreceptores nicotínicos no órgão eléctrico do *T. marmorata*. Serão necessárias mais experiências para caracterizar melhor o subtipo de nAChR envolvido na facilitação de ACh nesta preparação.

Palavras-chave: *T. marmorata*, libertação de ACh, nAChR pré-sinápticos, DMPP, Ca^{2+} intraterminal.

Abstract

This study focuses on the mechanisms involved in the modulation of cholinergic transmission by pre-synaptic nicotinic autoreceptors (nAChR). In this work, the *Torpedo marmorata*'s electric organ electrocytes were used as real time detectors of ACh release by measuring compound evoked electroplaque potentials (EPP) in single stacks of electrocytes (prisms). These potentials result from the synchronized release of ACh, from a myriad of synapses, allowing the study of nicotinic neuromodulation with submillisecond resolution.

The effect of a 5s bathing application of the nAChR agonist, 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide (DMPP), on prism electric potential was evaluated. DMPP concentration-dependently increased the amplitude (~20%) and the area (~37%) of EPPs (n=10). The effect of DMPP (0.1-10 μ M) on prism amplitude and area rose upon lowering extracellular calcium from 3.4 mM (normal physiological concentration) to 1.7, 1.275 and 0.85 mM. The results obtained of area/peak ratio and latency revealed that time parameters were less sensitive to calcium decrease. An endogenous response was presented in control preparations, and it was fully reverted by the nicotinic receptor antagonists, dihydro-beta-erythroidine (DH- β -E) and hexamethonium (HE). The electrophysiological studies revealed that acetylcholine (ACh) may enhance its own release by activating nAChRs and this mechanism may operate as a pre-synaptic amplifier to increase the safety factor for synaptic transmission, as already seen in the rat neuromuscular junction (Faria *et al.*, 2003).

In order to assess if DMPP action on electric responses was pre- or post-synaptic in nature, we blocked prism impulse conduction with TTX (1 μ M) and inhibited acetylcholinesterase activity with neostigmine (20 μ M). Under these conditions, bath application of ACh (100 μ M) evoked post-synaptic potentials higher than 100 mV for a few seconds, while DMPP (100 μ M) was ineffective (n=4), thus indicating that DMPP facilitates ACh release rather than a post-synaptic response of the prisms. To confirm this, synaptosomes from *Torpedo* electric organ were isolated and ACh release evaluated directly and continuously by chemiluminescence. DMPP raised the amount of ACh release (~30%) from synaptosomes depolarized by veratridine (100 μ M) or KCl (40 mM), thereby confirming the pre-synaptic nature of its effect. The facilitatory effect of DMPP on depolarized synaptosomes was prevented by DH- β -E (3 μ M, a α 3/4 β 2 nAChR antagonist), like that observed in the electrophysiology experiments using *Torpedo marmorata* electrocytes.

The spatial relationship between nAChR and active zones (for ACh release) was evaluated using electrophysiology focused on the enhancement of intraterminal Ca^{2+} , using the Ca^{2+} chelators BAPTA-AM and EGTA-AM. We observed that Ca^{2+} influences the modulation of ACh release through pre-synaptic nAChR. Furthermore, we demonstrated that the calcium sensors (responsible for ACh release) and the nAChR are not co-localized.

This study is the first attempt, to our knowledge, to investigate the role of pre-synaptic nAChRs in the electric organ of *Torpedo marmorata*. Additional assays are programmed to further characterize the nature of the nAChR activated by DMPP.

Keywords: *T. marmorata*, ACh release, pre-synaptic nAChR, DMPP, intraterminal Ca^{2+} .

Índice de Abreviaturas

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolina esterase

BAPTA-AM – 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético éster de acetoximetil

BTX – α -bungarotoxina

$[Ca^{2+}]_i$ – Concentração intracelular de Ca^{2+}

CCSV – Canais de cálcio sensíveis à voltagem

CTX MII – Conotoxina MII

DH- β -E - di-hidro-beta-eritroidina

DMPP – 1,1-dimetil-4-fenilpiperazínio

EGTA-AM – etileno glicol-bis(2-aminoetileter) etano-N,N,N',N'- ácido tetraacético éster de acetoximetil

EPP – Potenciais de electroplaca

HE – Hexametónio

HEPES – Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-etanossulfônico

JNM – Junção neuromuscular

MLA – Metilicaconitina

nAChR – Receptores nicotínicos de acetilcolina

VP0 – População de vesículas 0

VP1 – População de vesículas 1

VP2 – População de vesículas 2

VT - Veratridina

PPTM – Potenciais de placa terminal em miniatura

SNAP-25 – Proteína associada ao sinaptossoma-25

SNARE – Receptor de acoplamento do factor sensível à N-etilmaleimida

TTX – Tetrodotoxina

Os seguintes trabalhos foram apresentados como comunicações orais:



**XL REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE PORTUGUESA
DE FARMACOLOGIA,
XXVIII REUNIÃO DE FARMACOLOGIA CLÍNICA E
IX REUNIÃO DE TOXICOLOGIA
DEZEMBRO 2-4, 2009, PORTO, PORTUGAL**

**NICOTINIC MODULATION OF CHOLINERGIC TRANSMISSION IN THE
ELECTRIC ORGAN OF *TORPEDO MARMORATA***

A. Alves, P. Correia-de-Sá & J.M. Cordeiro

Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia / UMIB, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS) - Universidade do Porto, Portugal.

This study focuses on the mechanisms involved in the modulation of cholinergic transmission by presynaptic nicotinic autoreceptors (nAChRs). Acetylcholine (ACh) may enhance its own release during a period of repetitive nerve activity by activating nAChRs. This mechanism may operate as a presynaptic amplifier to increase the safety factor for synaptic transmission. This was clearly evidenced from studies using the neuromuscular junction measuring [³H]-ACh release, electrophysiological signals and mechanical tension in the presence of subtype selective nicotinic antagonists. The rat neuromuscular junction is equipped with $\alpha 3\beta 2$ -containing neuronal nAChRs mediating facilitation of ACh release, in addition to the classical muscle-type nicotinic receptors containing the $\alpha 1$ subunit (Faria *et al.*, 2003, *Synapse*, **49**, 77-82). In this work, we used the *Torpedo marmorata*'s electric organ electrocytes as real time detectors of ACh release by measuring compound evoked electroplaque potentials (EPP) in single stacks of electrocytes (prisms). These potentials result from the synchronized release of ACh, from a myriad of synapses, allowing the study of nicotinic neuromodulation with submillisecond resolution.

In total, fifteen *T. marmorata* fish of both sexes (15-50 cm total length) were used. The effect of a 5s bathing application of the nAChR agonist, 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide (DMPP), on prism electric potential was evaluated. DMPP concentration-dependently increased the amplitude (~20-30%) and the area (~43%) of EPPs (n=10). The area/peak ratio was also raised reflecting a prolongation of synaptic transmission. Latency and T50% decay time were augmented in 0.7 ms \pm 0.1 and 0.2 ms \pm 0.06, respectively.

The effect of DMPP (0.1-10 μ M) on prism amplitude and area rose upon lowering extracellular calcium from 3.4 mM (normal physiological concentration) to 1.7, 1.275 and 0.85 mM. Time parameters were less sensitive to calcium decrease perhaps because they are virtually independent from receptor field saturation while the amplitude and area are not. In order to assess if DMPP action on electric responses was pre- or postsynaptic, we blocked prism impulse conduction with TTX (1 μ M) and inhibited acetylcholinesterase activity with neostigmine (20 μ M). Under these conditions, bath applied ACh (100 μ M) was able to evoke postsynaptic potentials up to ~200 mV for a few seconds, while DMPP (100 μ M) was not (n=3), thus indicating that DMPP facilitates ACh release rather than a postsynaptic response of the prisms. To confirm, this we isolated synaptosomes from *Torpedo* electric organ where we evaluated ACh release directly in a real-time mode by chemiluminescence. DMPP raised the amount of ACh release induced with veratridine (100 μ M) by three fold, thereby confirming the presynaptic nature of its effect (n=5). In order to further characterize the nAChR subtype(s) involved in DMPP facilitation, we incubated the $\alpha 3/4\beta 2$ nAChR antagonist, dihydro-beta-erythroidine (DH- β -E, 1 and 3 μ M) prior to DMPP application and compared it with the $\alpha 7$ -bearing nAChR antagonist methyllycaconitine (MLA, 3 μ M).

Preliminary results indicate that DMPP modulation is significantly attenuated by DH- β -E while MLA is without effect. Further assays are programmed to determine the molecular nature of DMPP target as well as its mode of action on a rapid synapse.

This work was supported by FCT (FEDER funding, UMIB-215/94) and FSE-POPH-QREN.



INVESTIGAÇÃO JOVEM
NA UNIVERSIDADE DO PORTO
(3º Encontro de Jovens Investigadores da U. Porto)
FEVEREIRO 17-19, 2010, PORTO, PORTUGAL

**Nicotinic modulation of cholinergic
neurotransmission in the electric organ of *Torpedo marmorata***

A. Alves, P. Correia-de-Sá & J.M. Cordeiro

Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia / UMIB, Instituto de Ciências Biomédicas de
Abel Salazar (ICBAS) - Universidade do Porto, Portugal.

This study focuses on the mechanisms involved in the modulation of cholinergic neurotransmission by presynaptic nicotinic autoreceptors (nAChRs) in the electric organ of *Torpedo marmorata*. Studies performed at the rat motor endplate demonstrated that acetylcholine (ACh) enhance its own release during a period of repetitive nerve activity by activating nAChRs. This mechanism may operate as a presynaptic amplifier to increase the safety factor of neuromuscular transmission. Measuring [³H]-ACh release, electrophysiological signals and mechanical tension in the presence of subtype selective nicotinic antagonists, we demonstrated the presence of $\alpha 3\beta 2$ -containing neuronal nAChRs mediating facilitation of ACh release in addition to the classical nicotinic receptors containing the $\alpha 1$ subunit on the skeletal muscle fibres [1,2]. In this work, *Torpedo marmorata*'s electric organ electrocytes were used as real time detectors of ACh release by measuring compound evoked electroplaque potentials (EPP) in single stacks of electrocytes (prisms). These potentials result from the synchronized release of ACh, from a myriad of synapses, allowing the study of nicotinic neuromodulation with submillisecond resolution. The effect of a bathing application of the nAChR agonist, 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide (DMPP), on prism electric potential was evaluated. DMPP concentration-dependently increased the amplitude (~20-30%) and the area (~43%) of EPPs (n=10). The effect of DMPP (0.1-10 μ M) on prism amplitude and area rose upon lowering extracellular calcium from 3.4 mM (normal physiological concentration in the *Torpedo*) to 1.7, 1.275 and 0.85 mM. Time parameters were less sensitive to calcium decrease perhaps because they are virtually independent from receptor field saturation while the amplitude and area are not. Endogenous facilitation was reverted with the nicotinic receptor antagonists, dihydro-beta-erythroidine (DH- β -E) and hexamethonium (HE). In order to assess if DMPP action on electric responses was pre- or post-synaptic, we blocked prism impulse conduction with TTX (1 μ M) and inhibited acetylcholinesterase activity with neostigmine (20 μ M). Under these conditions, bath applied ACh (100 μ M) was able to evoke postsynaptic potentials higher than 100 mV for a few seconds, while DMPP (100 μ M) was not (n=4), thus indicating that DMPP facilitates ACh release rather than a post-synaptic response of prisms. To confirm this, synaptosomes from *Torpedo* electric organ were isolated where we evaluated ACh release directly by chemiluminescence. DMPP raised the amount of ACh release (~30%) induced with veratridine (100 μ M) and KCl (40 mM), thereby confirming the pre-synaptic nature of its effect. In this preparation the $\alpha 3/4\beta 2$ nAChR antagonist, dihydro-beta-erythroidine (DH- β -E, 3 μ M), was incubated, in order to further characterize the nAChR subtype(s) involved in DMPP facilitation. Preliminary results indicate that DMPP facilitation was significantly attenuated by DH- β -E. Incubating prisms with BAPTA-AM or EGTA-AM, exposed the spatial relationship between pre-synaptic nAChR and the calcium sensors (responsible for ACh release), thus evidencing that they are not co-localized.

To our knowledge, this is the first attempt to investigate the role of pre-synaptic nAChRs in the electric organ of *Torpedo marmorata*. Further assays are programmed to further characterize the nature of the nAChR activated by DMPP and to establish its mode of action on *Torpedo* electric organ rapid synapses.

[1] Faria M, Oliveira L, Timóteo MA, Lobo MG, Correia-De-Sá P. (2003). *Synapse* **49**:77-88;

[2] Timóteo MA, Faria M, Correia-de-Sá P (2003). *Eur J Pharmacol* **464**:115-125.

This work was supported by FCT (FEDER funding, UMIB-215/94) and FSE-POPH-QREN.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
Resumo	vi
Abstract	viii
Índice de abreviaturas	x
Comunicações orais	xi
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. O <i>Torpedo marmorata</i> : biologia	1
1.1.1. Sistema electromotor do <i>Torpedo marmorata</i>	2
1.1.2. Homologia com a junção neuromuscular	6
1.2. <i>Torpedo marmorata</i> , como modelo biológico e estudos realizados	7
1.3. Receptores nicotínicos de ACh (nAChR)	9
1.3.1. nAChR pré-sinápticos	10
1.3.2. nAChR pós-sinápticos	11
1.4. Estudos prévios sobre os nAChR	11
II. OBJECTIVOS	13
III. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Amostragem do tecido biológico	15
3.1.1 Captura e manutenção dos espécimes experimentais	15
3.1.2 Preparação do meio de Krebs para <i>Torpedo</i>	16
3.1.3 Eutanásia e isolamento do órgão eléctrico de <i>T. marmorata</i>	16
3.2 Metodologia electrofisiológica	17
3.2.1 Sistema de estimulação e avaliação da actividade eléctrica dos prismas	17
3.2.2 Condições gerais da estimulação e da avaliação da actividade eléctrica dos prismas	19
3.2.3. Características dos Potenciais de Electroplaca analisados	19
3.2.3.1. Latência	20
3.2.3.2. Fase de ascensão	20
3.2.3.3. Amplitude máxima (Pico)	20
3.2.3.4. Área	20
3.2.3.5. Fase de decaimento	20
3.3 Bioluminescência	20
3.3.1 Preparação de sinaptossomas de órgão eléctrico de <i>Torpedo marmorata</i>	20

3.3.2 Quantificação da libertação de ACh pelos sinaptossomas	23
3.4. Imagiologia da junção neuro-eléctrica de <i>T. marmorata</i>	24
3.5. Fármacos utilizados	24
3.6. Análise Estatística	25
IV. RESULTADOS	27
4.1. Microscopia de fluorescência	27
4.2. Dados electrofisiológicos	27
4.2.1. Efeito do agonista dos nAChR (DMPP)	27
4.2.2. O efeito do DMPP é pré- ou pós-sináptico?	32
4.3. Dados de bioluminescência (sinaptossomas)	34
4.3.1. Sinaptossomas despolarizados pela veratridina: Efeito do DMPP e seu antagonismo pela DH-β-E	34
4.3.2. Sinaptossomas despolarizados pelo KCl: Efeito do DMPP e seu antagonismo pela DH-β-E	35
4.4. Efeito de agentes quelantes rápidos e lentos de Ca ²⁺	36
V. DISCUSSÃO	39
VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	49
Referências bibliográficas	51
ANEXOS	AI

I. INTRODUÇÃO

1.1. O *Torpedo marmorata*: biologia

O *Torpedo marmorata* (Risso, 1810), vulgarmente conhecido por tremelga ou tremedeira, é um elasmobrânquio da família Torpedinidae (Revisto por Stehmann & Bürkel, 1984). Morfologicamente, esta espécie possui um corpo achatado em forma de disco, a cauda é curta com uma grande barbatana caudal. As duas barbatanas dorsais estão localizadas na cauda, e são de tamanho similar. A face dorsal é caracterizada por tons marmoreados de castanho claro e escuro, e a face ventral é branco-creme (Revisto por Picton & Morrow, 2009) (figura 1). Esta espécie exibe viviparidade aplacentária, o acasalamento ocorre entre Novembro e Janeiro, a ovulação entre Dezembro e Fevereiro, e a época de postura é no mês de Dezembro seguinte, após 10 a 12 meses de gestação (Abdel-Aziz, 1994). É uma espécie indígena do Atlântico Este, amplamente distribuída desde o norte do Reino Unido (menos comum no sul do Mar do Norte e Kattegat) até ao Cabo da Boa Esperança (África do Sul), incluindo o Mar Mediterrâneo (van der Land *et al.*, 2001). O *T. marmorata* tem preferência por habitats associados a áreas de ervas marinhas, recifes rochosos e fundos arenosos (Michael, 1993), com profundidades compreendidas entre os 2 e 370 metros (Capapé & Desoutter, 1990).



Figura 1: Fotografia de *Torpedo marmorata*.

Durante o dia, o *T. marmorata* enterra-se no substrato deixando apenas os olhos e o espiráculo salientes (Göthel, 1992), evitando temperaturas acima dos 20°C (Møller, 1995). Sendo uma espécie noturna, o seu período de maior actividade ocorre durante a noite, durante o qual se alimenta, maioritariamente, de peixes bentónicos vivos. Os juvenis têm uma alimentação com uma maior variabilidade (peixes bentónicos, crustáceos e cefalópodes) (Abdel-Aziz, 1994), enquanto os adultos alimentam-se quase

exclusivamente de peixes (*Trachurus*, *Mugil*, *Mullus*, *Dicentrarchus*, *Spondyliosoma*, *Boops*, *Labrus*, *Dascyllus*, *Pomacentrus*) (Møller, 1995).

Em condições naturais, esta espécie emite descargas eléctricas curtas e sucessivas até 60 V, com frequências entre 100-300 Hz (Belbenoit, 1970 *in* Walz *et al.*, 1995). As características deste tipo de descarga dependem de factores endógenos (maturação ontogénica) e de factores exógenos (temperatura), e é utilizada em dois tipos de comportamento – defensivo e predatório, dependendo do estímulo que o espécime recebe do exterior (Belbenoit, 1986). O comportamento defensivo, ocorre quando o animal se sente ameaçado (predadores, por exemplo), no qual as descargas eléctricas duram 0,1 s e possuem uma frequência elevada (300 Hz). Esta espécie possui dois tipos de comportamento predatório, a predação de salto e a rastejante, que varia consoante o movimento da potencial presa (Belbenoit, 1986). Neste tipo de resposta as descargas eléctricas têm como finalidade paralisar, atordoar ou até matar as presas, de modo a facilitar a sua captura (Belbenoit, 1986; Picton & Morrow, 2009). Estas descargas possuem uma duração de 24 s, ainda que a sua frequência seja menos elevada (Fessard, 1958).

1.1.1. Sistema electromotor do *Torpedo marmorata*

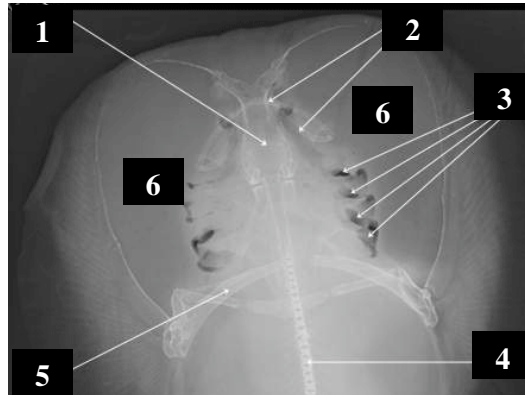
Várias espécies possuem a capacidade de produzir bioelectricidade. A presença de um sistema electromotor em espécies que não são correlacionadas filogeneticamente, representa um bom exemplo de evolução convergente (Gotter *et al.*, 2001 *in* Sperelakis, 2001). Este sistema pode ter duas funções distintas, no caso da espécie estudada é um mecanismo de defesa e predação, mas existem outras espécies que usam este sistema para electrolocalização e electrocomunicação (Walz *et al.*, 1995).

O *T. marmorata* possui receptores sensoriais especializados em detectar presas e perigos. Estes estão localizados na zona frontal dorsal e na cauda, e são denominados mecanorreceptores. Aquando da sua activação, a informação é transmitida ao sistema electromotor, constituído pelos lóbulos eléctricos, órgãos eléctricos, terminais nervosos e electrócitos (Sheridan, 1965).

Na família Torpedinidae, a descarga eléctrica é coordenada pelo tronco cerebral (Davies *et al.*, 1977), onde se localizam os lóbulos eléctricos. Estes lóbulos são eminências gémeas no tronco cerebral localizados por trás do cerebelo (Walz *et al.*, 1995), constituídos por cerca de 60 000 neurónios electromotores (Schmid *et al.*, 1982 *in* Walz *et al.*, 1995). A transmissão do sinal é realizada por 4 nervos eléctricos principais, que têm como origem estes neurónios, cujo corpo celular está localizado no

lóbulo eléctrico e os terminais nervosos pré-sinápticos no órgão eléctrico (Walz *et al.*, 1995). Os nervos eléctricos, após a passagem entre as brânquias, ramificam-se numa rede colinérgica extensa de terminais electromotores, que inerva os órgãos eléctricos (Davies *et al.*, 1977). A excitação desta rede leva à libertação de ACh, que por sua vez, gera uma despolarização local das electroplacas (Grundfest, 1957).

Os órgãos eléctricos são massas de tecido gelatinoso em forma de rim, que ocupam o espaço entre as fendas branquiais e as barbatanas marginais da região da cabeça (figura 2). Estes órgãos são constituídos por 400 colunas, dispostas numa matriz hexagonal, denominadas prismas (Marchbanks & Israël, 1971). Cada prisma é constituído por cerca de 500 células achatadas empilhadas umas sobre as outras, denominadas electrócitos (Feldberg & Fessard, 1942). Estas células desenvolveram-se a partir de miotúbulos, possuindo a mesma origem embrionária que as células dos músculos esqueléticos (Sheridan, 1965). Estas electroplacas são inervadas exclusivamente na sua superfície ventral, por terminais electromotores que cobrem 80% da sua superfície. Sendo muito mais inervados do que o músculo esquelético, pois o órgão eléctrico contém cerca de 1000 vezes mais material sináptico do que o seu peso equivalente em tecido muscular (Wittaker, 1987).



Legenda:

- 1 – Crânio
- 2 – Mandíbulas
- 3 – Fendas branquiais
- 4 – Coluna vertebral
- 5 – Cintura peitoral
- 6 – Órgãos eléctricos

Figura 2: Raio-X de *Torpedo marmorata*, onde é possível observar a localização dos órgãos eléctricos (adaptado do CD : Atlas anatomique d'ichthyologie da Unité d'Anatomie comparée da Societé Francaise D'Ichthyologie)

Os electrócitos são estruturas excitáveis quimicamente, mas são electricamente inertes. As sinapses electromotoras são colinérgicas. A libertação de um neurotransmissor químico, a ACh, produz potenciais de electroplaca (EPP) através da sua interacção com receptores nicotínicos de ACh (nAChR) pós-sinápticos. Segundo Bennett *et al.* (1961), a aplicação artificial de fortes estímulos eléctricos (despolarizantes e hiperpolarizantes) não produz qualquer resposta nos electrócitos nem variações na latência da resposta induzida pelos estímulos neuronais.

A excitação dos terminais, que inervam a face ventral dos electróitos, leva a uma libertação abrupta de ACh, que activa receptores nicotínicos presentes nas membranas dos electróitos, originando os EPPs (Walz *et al.*, 1995). Cada receptor nicotínico é de facto um canal iónico permeável a catiões monovalentes (Na^+ e K^+), cuja activação é detectada através da variação transitória do potencial de membrana dos electróitos no sentido da despolarização. O influxo iónico torna a membrana celular dos electróitos menos negativa relativamente ao potencial de membrana em repouso. A descarga eléctrica sincronizada do órgão eléctrico resulta do somatório, em série e em paralelo, da despolarização pós-sináptica simultânea de todos os electróitos (Walz *et al.*, 1995; Feldberg & Fessard, 1942).

O órgão eléctrico do *Torpedo* contém cerca de 4 a 6×10^{11} sinapses rápidas, capazes de coordenar uma única descarga eléctrica, cuja duração varia entre 2 a 4 ms. Neste tipo de sinapses, o quantum de neurotransmissor é emitido em menos de 100 μs . A brevidade da transmissão é assegurada pela hidrólise rápida da ACh pela AChE, que existe em grande concentração na fenda sináptica, e também pelo pequeno período de tempo em que os receptores nicotínicos se encontram abertos (0,6 ms); este tempo é cerca de dez vezes mais rápido do que o observado na JNM (Sackmann *et al.*, 1985). Para este fenómeno ser tão rápido, tanto a AChE como os nAChR necessitam de ter reduzida afinidade para a ACh (Dunant *et al.*, 2009).

Os 3 elementos, responsáveis pela transmissão da informação e, conseqüente, libertação “instantânea” de ACh e activação dos nAChR, são o terminal pré-sináptico, a fenda sináptica, e o terminal pós-sináptico (Fagerlund & Eriksson, 2009).

O terminal pré-sináptico possui uma arquitectura adequada, sendo desenvolvido para garantir a síntese e a libertação do neurotransmissor, a incorporação deste em vesículas sinápticas, e o transporte de iões através da membrana do terminal nervoso (Rochon *et al.*, 2001).

Quando um potencial de acção chega ao terminal pré-sináptico, os canais de cálcio sensíveis a voltagem (CCSV) existentes na zona activa em densidade elevada, abrem para permitir o influxo de cálcio para dentro da célula, levando a um aumento transitório da concentração de cálcio intracelular. Nesta fase, três proteínas SNARE (o receptor de acoplamento do factor sensível à N-etilmaleimida), a sinaptobrevina, a syntaxina, e proteína associada ao sinaptossoma-25 (SNAP-25), possuem funções essenciais na fixação das vesículas sinápticas à membrana celular. O aumento da concentração regional de cálcio é percebido por sensores de cálcio associados às

membranas das vesículas, denominadas sinaptotagminas. As sinaptotagminas vão mediar a formação de complexos das três proteínas SNARE que vão conduzir a vesícula sináptica à adesão, fusão e posterior libertação do neurotransmissor para a fenda sináptica (Heidelberger, 2007). Quando um potencial de acção chega ao terminal nervoso, centenas de vesículas são libertadas sincronamente, cujo somatório corresponde a um potencial de placa (Cohen-Cory, 2002).

Segundo Katz (1969), na junção neuromuscular (JNM), a libertação do neurotransmissor possui uma natureza quântica. A ACh é sintetizada, armazenada em vesículas sinápticas e libertada pelo terminal nervoso, por exocitose, num processo dependente de energia. As vesículas são armazenadas em locais específicos (zonas activas) perto da membrana celular pré-sináptica em situação oposta aos receptores de ACh localizados na membrana pós-sináptica. Assim, a ACh é prontamente libertada e tem de percorrer uma distância mínima para atingir os seus locais de ligação pós-sináptico. Apesar de existirem estudos que sugerem a existência de uma distribuição aleatória das vesículas no interior do terminal nervoso, a opinião generalizada é de que estas se localizam preferencialmente em situação de serem libertadas rapidamente após a chegada de um potencial de acção nervoso (Rizzoli & Betz, 2004).

Dunant *et al.* (1972) sugeriram a existência de um mecanismo adicional responsável pela libertação de ACh no *Torpedo*. Estes autores basearam-se em análises bioquímicas, realizadas durante e após a libertação do transmissor, cujos resultados demonstraram que a ACh contida em vesículas constitui um reservatório relativamente estável, que não parece ser imediatamente mobilizado pela estimulação nervosa. Neste tecido, a ACh citoplasmática parece ser a que é rapidamente utilizada e reciclada, sendo esta considerada como a fonte imediata do neurotransmissor libertado (Dunant *et al.*, 1972). Estes autores mostraram, ainda, que a transmissão de um único impulso nervoso na junção com a electrolaca não se acompanhava da fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática, mas sim por um aumento transitório de partículas intermembranares (Dunant & Muller, 1986).

No órgão eléctrico do *Torpedo marmorata*, o mecanismo secretor parece envolver a libertação de ACh directamente a partir do citoplasma (revisto por Dunant *et al.*, 2009). Em 1984, Israël *et al.* identificaram um proteolípido denominado mediatofofo, e constataram que na ausência de vesículas sinápticas, a fracção de proteína derivada da membrana do terminal nervoso promove a libertação de ACh de forma dependente do influxo de Ca^{2+} . Nas zonas activas da membrana pré-sináptica

onde se espera que ocorra a libertação, foram observados aglomerados de mediatoforos direccionados para os prolongamentos pós-sinápticos (Dunant *et al.*, 2009). Estas observações apontam para um sistema de libertação do neurotransmissor dependente de Ca^{2+} inserido na membrana pré-sináptica, que usa preferencialmente ACh citoplasmática (Dunant & Muller, 1986).

A fenda sináptica contém complexos moleculares, que garantem o arranjo estrutural da junção neuro-eléctrica (ou neuro-muscular) permitindo a rápida difusão de ACh, a transmissão do sinal (após ligação aos nAChR pós-sinápticos) e a inactivação do neurotransmissor. A rápida difusão do neurotransmissor é promovida pela curta distância entre os locais de libertação e a membrana pós-sináptica. A elevada concentração de neurotransmissor atingida na fenda sináptica é limitada no tempo pela acção de moléculas como a acetilcolinesterase (AChE) garantindo uma neurotransmissão adequada. A ACh é degradada rapidamente pela AChE em acetato e colina, esta degradação é responsável pelo fim da acção da ACh (Fagerlund & Eriksson, 2009).

O componente pós-sináptico é composto por uma membrana celular que possui invaginações, onde se localizam os nAChR. Na junção neuromuscular, este terminal é altamente especializado e intimamente associado a zonas com elevada densidade de canais de sódio, com a finalidade de promover e amplificar o sinal, garantindo a propagação da actividade eléctrica (Fagerlund & Eriksson, 2009).

Mesmo em repouso (ausência de um potencial de acção no terminal pré-sináptico), podem detectar-se pequenos potenciais de placa espontâneos no terminal pós-sináptico. Estes potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) são o resultado da libertação espontânea de um pequeno número de moléculas de ACh, possivelmente, a partir de uma única vesícula ou da abertura de um único mediatoforo (no *Torpedo*) - libertação quântica (Cohen-Cory, 2002).

1.1.2. Homologia com a junção neuromuscular

O sistema electromotor do *T. marmorata* é homólogo ao sistema neuromuscular, partilhando características estruturais, funcionais e farmacológicas. Embora o órgão eléctrico seja embriologicamente homólogo ao sistema neuromuscular, estes diferem em alguns aspectos importantes.

Morfológicamente, as terminações nervosas do órgão eléctrico estão organizadas numa rede muito ramificada, diferindo da junção neuromuscular também relativamente

ao seu tamanho e nível de organização estrutural (ausência de verdadeiras placas motoras). As vesículas sinápticas dos terminais do órgão eléctrico possuem um diâmetro quase duas vezes maior que as da junção neuromuscular (Dunant & Muller, 1986).

Relativamente aos potenciais descritos por Dunant & Muller (1986) no órgão eléctrico de *Torpedo*, estes autores verificaram que os parâmetros de duração e amplitude são cerca de 5 vezes menores do que aqueles obtidos de forma semelhante por Datyner & Gage (1982) na JNM da rã.

Apesar das diferenças existentes entre os dois sistemas, eles assemelham-se muito do ponto de vista eletrofisiológico e neuroquímico, nomeadamente no que respeita à presença de potenciais espontâneos miniatura, à composição quântica da libertação de ACh, à taxa de libertação por unidade de superfície, ao tamanho molecular do quantum de ACh, ao acoplamento dos fenómenos de estimulação e secreção e aos efeitos resultantes da despolarização prolongada (Dunant & Muller, 1986). Os terminais sinápticos do órgão eléctrico são ricos em ACh e AChE, tal como acontece nas fibras musculares esqueléticas, indicando que a transmissão sináptica dos terminais pré-sinápticos para a superfície inervada das placas se processa de forma semelhante à junção neuromuscular (Sheridan, 1965). Feldberg & Fessard (1942) consideraram que o órgão eléctrico é um conjunto de placas motoras modificadas, sem a estrutura contráctil das fibras musculares voluntárias. A transmissão colinérgica das sinapses electromotoras do *Torpedo* assemelha-se à da junção neuromuscular dos batráquios e dos mamíferos. A sua susceptibilidade a fármacos é semelhante e os PPTM (0,2 - 0,4 mV) detectados na sinapse electromotora possuem uma amplitude similar aos potenciais miniatura de placa observados na junção neuromuscular (Miledi *et al.*, 1971 *in* Walz *et al.*, 1995; Dunant *et al.*, 1980; Soria, 1983; Erdelyi & Krenz, 1984 *in* Walz *et al.*, 1995; Dunant & Muller, 1986).

1.2. *Torpedo marmorata*, como modelo biológico e estudos realizados

A descoberta de peixes eléctricos influenciou muito o desenvolvimento da biologia. Nos finais do séc. XVIII, as descargas eléctricas eram o melhor exemplo de bioelectricidade conhecido, e foram objecto de estudo intensivo para a compreensão de potenciais de repouso de membrana, gradientes iónicos e da equação de Nernst (Whittaker, 1987; Walz *et al.*, 1995).

A natureza colinérgica das sinapses electromotoras do *Torpedo* foi descoberta em 1932, por Feldberg e Fessard (1942). Nachmansohn & Lederer (1939) mostraram a existência de uma elevada actividade da AChE no tecido eléctrico e formularam uma teoria pioneira para explicar a transmissão em tecidos excitáveis, que reconhecia a dependência da geração de potenciais eléctricos e subsequente síntese e degradação local de moléculas neurotransmissoras, como por exemplo a ACh.

Em 1963, Whittaker *et al.* utilizaram o tecido eléctrico do *Torpedo* como material de estudo de componentes pré-sinápticos colinérgicos (sinaptossomas, vesículas sinápticas, membranas plasmáticas pré-sinápticas, transporte axonal, e reciclagem vesicular), analisando assim os mecanismos de síntese, armazenamento e libertação de ACh, e ainda a estrutura, função e ciclo de vida das vesículas sinápticas (Whittaker, 1986).

Os terminais pré-sinápticos isolados (sinaptossomas) retêm as principais características estruturais e funcionais das terminações nervosas e têm vindo a ser utilizados para estudar o metabolismo pré-sináptico e os mecanismos de libertação do neurotransmissor. Além disso, durante o processo de isolamento e purificação destes terminais pré-sinápticos, não existe perda de propriedades e mecanismos fisiológicos importantes, tal como o transporte de colina e acetato enquanto precursores da síntese de ACh, a reduzida permeabilidade aos iões como Na^+ e Cl^- , o aumento da entrada de cálcio após despolarização com KCl e a libertação da ACh de forma dependente de cálcio e de ATP (Morel *et al.*, 1982).

Dunant & Muller (1986) observaram dois tipos de resposta eléctrica no órgão do *Torpedo*. O primeiro tipo, assemelha-se muito à resposta pós-sináptica produzida pela despolarização local em sinapses neuromusculares tratadas com tetrodotoxina (TTX). Esta resposta é, muito provavelmente, resultante de uma despolarização local dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (CCSV) presentes nas terminações nervosas. O segundo tipo, cuja resposta é do tipo “tudo-ou-nada”, observa-se quando a membrana neuronal é despolarizada o suficiente para que a entrada de sódio exceda o efluxo de potássio. Este potencial de membrana é denominado limiar de excitação, e os estímulos suficientemente fortes para despolarizar a membrana a este nível são denominados estímulos limiaries. Aqui a libertação de ACh é provocada por um potencial de acção pré-sináptico, onde o atraso desta resposta tudo-ou-nada reflecte a duração do potencial de acção. Os mesmos autores concluíram, ainda, que no órgão eléctrico os CCSV estão

amplamente distribuídos em todo o comprimento da rede dos terminais nervosos, enquanto os canais de Na^+ estão presentes apenas em determinadas áreas restritas.

A espécie *T. marmorata* está caracterizada como um sistema ideal para estudar a bioquímica da transmissão colinérgica, possuindo vastas aplicações em neurobiologia (Whittaker, 1987), já que o tecido dos órgãos eléctricos é na sua totalidade colinérgico, e completamente homogéneo relativamente ao neurotransmissor químico utilizado. Para além destes factores, as vesículas contendo ACh podem ser isoladas sem submeter o tecido a um choque osmótico (como é o caso da preparação de córtex cerebral dos mamíferos) e a concentração de ACh no órgão eléctrico é 20 a 40 vezes superior à existente no córtex dos mamíferos (Marchbanks & Israël, 1971).

O *T. marmorata* é de um ponto de vista prático um bom modelo biológico devido à sua disponibilidade, quantidade de tecido por espécime, e densidade de material sináptico (Whittaker, 1998). Possibilita estudos de libertação de ACh em tempo real e, como utiliza a transmissão rápida de ACh para produzir descargas eléctricas muito sincronizadas, possibilita a realização de estudos de neuromodulação com uma resolução de milésimos de segundos (Dunant *et al.*, 1980).

1.3. Receptores nicotínicos de ACh (nAChR)

Os nAChR pertencem à família de canais iónicos activados por ligandos (Millar & Gotti, 2009). Este grupo de proteínas transmembranares forma poros cheios de água após a ligação ao neurotransmissor, onde os iões podem fluir ao longo da membrana (Le Novere *et al.*, 2002). Os nAChR podem ser divididos em dois grupos: os receptores musculares, que na JNM esquelética medeiam a transmissão neuromuscular; e os receptores neuronais, envolvidos na transmissão sináptica rápida, localizados em todo o sistema nervoso periférico e central (Hogg *et al.*, 2003).

Estão descritos doze genes que codificam os nAChR neuronais (Le Novere *et al.*, 2002). Cada gene codifica uma sub-unidade do receptor que pode ser classificado em uma sub-unidade tipo α e não- α , com base na presença ou ausência, respectivamente, de um par de cisteína. Este par de cisteína é importante para a ligação do agonista, o que leva a crer que as sub-unidades, pelo menos em parte, podem regular a ligação do agonista (Gotti *et al.*, 2006).

Os nAChR são estruturas pentaméricas constituídas por combinações de sub-unidades individuais. Existem doze sub-unidades neuronais nAChR descritas, $\alpha 2$ - $\alpha 10$ e $\beta 2$ - $\beta 4$, que são expressas em todo o sistema nervoso e se combinam para formar nAChR

com uma grande variedade de perfis fisiológicos e farmacológicos (Hogg *et al.*, 2003). Estas sub-unidades podem possuir variadas estequiometrias para formar o canal (Millar & Gotti, 2009). Os receptores nicotínicos podem ser canais homoméricos ou heteroméricos. Os canais heteroméricos são formados por uma combinação entre sub-unidades α e β , enquanto as sub-unidades α formam os canais homoméricos (figura 3).

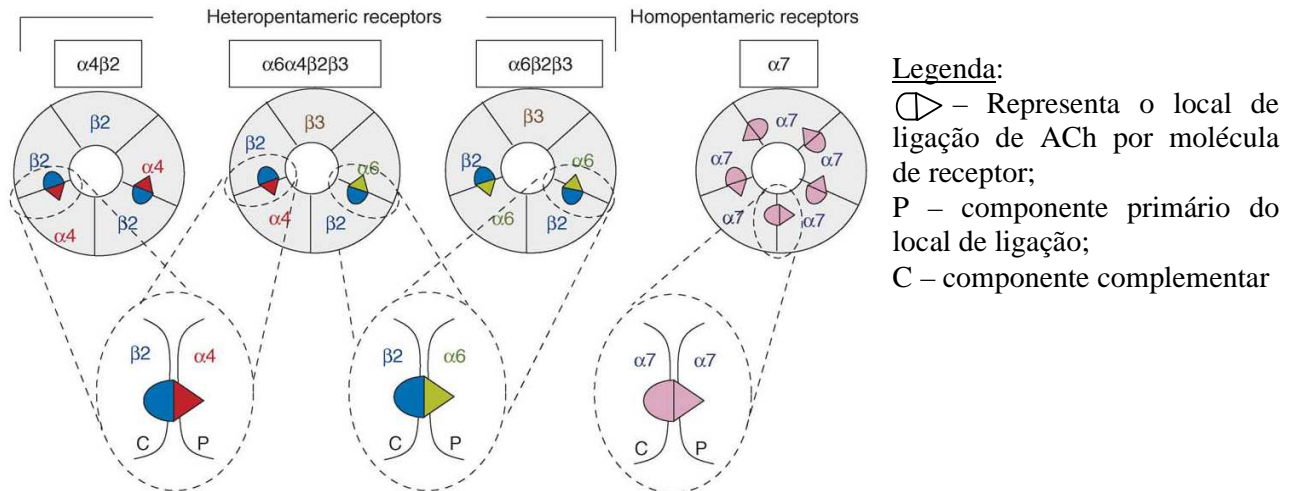


Figura 3: Organização e estrutura de subtipos de nAChR (heteromérico e homomérico) adaptado de Gotti *et al.* (2006).

Quando aberto, o receptor nicotínico é um canal de cátions selectivo que permite o fluxo de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} através da membrana. Este fluxo leva a uma despolarização do potencial de membrana em repouso. O impacto da activação dos receptores neuronais depende da composição das suas sub-unidades. Cada combinação de sub-unidades tem as suas próprias características de activação, dessensibilização, condutância e selectividade relativamente ao agonista, possuindo assim, diferentes cinéticas de despolarização da célula-alvo (Millar & Gotti, 2009; Lukas *et al.*, 1999).

Outra característica peculiar destes receptores é a sua permeabilidade ao ião cálcio. Os aminoácidos que envolvem o poro da proteína determinam em grande parte a selectividade iónica do canal. Por exemplo as sub-unidades $\alpha 7$ são altamente permeáveis ao cálcio, em comparação com as sub-unidades $\alpha 4 \beta 2$ (Fucile, 2004). O influxo de cálcio pode influenciar directamente processos celulares como a libertação de neurotransmissores e a plasticidade sináptica. Os estudos funcionais revelaram que os nAChR contribuem para o controlo do potencial de repouso da membrana, para a modulação da transmissão sináptica e para a mediação de transmissão excitatória rápida (Hogg *et al.*, 2003).

1.3.1. nAChR pré-sinápticos

Estes receptores estão localizados no terminal nervoso pré-sináptico, sendo responsáveis pelo aumento da libertação de ACh na fenda sináptica, durante a estimulação de elevada frequência do nervo pré-sináptico (Bowman *et al.*, 1990). Estes receptores colinérgicos não são inibidos pela α -bungarotoxina (BTX), mas sim por agentes bloqueadores neuromusculares não despolarizantes e pelo hexametônio (HE) (Fagerlung & Eriksson, 2009).

1.3.2. nAChR pós-sinápticos

A ACh libertada a partir da terminação nervosa motora liga-se aos nAChR da membrana pós-sináptica e provoca a despolarização desta. Existem três diferentes subtipos de nAChR presentes na membrana muscular pós-sináptica, no músculo fetal $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ e adulto $\alpha 1\beta 1\gamma\epsilon$ e receptores do subtipo $\alpha 7$ neuronais (Missias *et al.*, 1996).

1.4. Estudos prévios sobre os nAChR

Os nAChR pós-sinápticos do *T. marmorata* estão bem caracterizados a nível estrutural e funcional (Kubalek *et al.*, 1987; Edry-Schiller *et al.*, 1991 in Shafir *et al.*, 1998; Valenzuela *et al.*, 1994), mas a caracterização farmacológica dos receptores pré-sinápticos é inexistente.

Em preparações de hemidiafragma de rato, têm vindo a ser desenvolvidos estudos sobre a capacidade dos nAChR pré-sinápticos regularem a transmissão colinérgica. A partir da utilização de vários antagonistas nicotínicos e da análise da sua capacidade de bloqueio em estudos de libertação de ACh tritiada, provou-se que o subtipo de nAChR pré-sináptico envolvido na depressão tetânica possuía sub-unidades $\alpha 3\beta 2$ (Faria *et al.*, 2003; Timóteo *et al.*, 2003)

A modulação da actividade sináptica depende do balanço entre a activação de processos facilitatórios e inibitórios. Sendo assim, as características do estímulo realizado (frequência, número e duração dos pulsos), podem influenciar em grande medida a libertação de ACh através da activação de receptores pré-sinápticos colinérgicos (Wessler, 1989), purinérgicos (Correia-de-Sá *et al.*, 1996) ou outros.

Durante a estimulação de elevada frequência, observa-se uma depressão dos potenciais de placa que é resultante da diminuição do conteúdo quântico dos terminais nervosos (Matzner *et al.*, 1988). A depressão tetânica ou inibição Wedensky é a incapacidade de um músculo para manter a tensão, durante a estimulação de elevada

frequência (30-80 Hz) do nervo motor na presença de relaxantes musculares não despolarizantes como a tubocurarina (van der Kloot & Molgo, 1994). Assim, foi sugerido que o bloqueio da contracção e a depressão tetânica são acções separadas e independentes; a contracção está relacionada com a competição de receptores nicotínicos pós-sinápticos, enquanto que a depressão tetânica resulta principalmente de uma acção pré-sináptica dos antagonistas dos nAChR (Gibb & Marshall, 1986).

Estudos de contracção muscular e respostas electrofisiológicas na presença de antagonistas nicotínicos, mostraram a existência de um mecanismo de autoregulação positiva mediada por receptores nicotínicos, ou seja, a ACh pode aumentar a sua própria libertação durante um período de actividade repetitiva do nervo motor através da activação de nAChR pré-sinápticos (Bowman *et al.*, 1988; Waud & Waud, 1971; Singh & Prior, 1998; Wood and Slater, 2001). A autofacilitação nicotínica pode constituir um amplificador temporário pré-sináptico capaz de aumentar a margem de segurança da transmissão (Wood & Slater, 2001). Estudos realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS mostraram que o nAChR que medeia a facilitação da libertação de ACh na junção neuromuscular de rato é constituído por sub-unidades $\alpha 3\beta 2$ (Faria *et al.*, 2003; Timóteo *et al.*, 2003), e que o mesmo é diferente do receptor contendo sub-unidades $\alpha 1$ existente nas fibras musculares (Faria *et al.*, 2003).

II. OBJECTIVOS

Este estudo pretendeu avaliar os mecanismos responsáveis pela modulação da neurotransmissão colinérgica no órgão eléctrico do *Torpedo marmorata* através da manipulação da actividade do nAChR pré-sináptico. Este trabalho é pioneiro, já que não se conhecem estudos sobre a presença, o tipo e/ou a actividade destes receptores no órgão eléctrico do *Torpedo marmorata*, ao contrário dos receptores nicotínicos existentes na superfície dos electrócitos cuja estrutura e função está muito bem caracterizada.

Os electrócitos do órgão eléctrico de *Torpedo marmorata* foram usados neste trabalho como detectores da libertação de ACh em tempo real através da medição de EPPs, que resultam da libertação síncrona de ACh a partir de milhões de sinapses. Comparativamente aos métodos (neuroquímicos e electrofisiológicos) descritos para avaliar a transmissão neuromuscular esquelética, a utilização da junção neuroeléctrica do *T. marmorata* apresenta vantagens adicionais quanto à facilidade de isolamento dos terminais nervosos pré-sinápticos (sinaptossomas), permitindo quantificar directamente a libertação de ACh sem recorrer ao uso de inibidores da AChE.

Tendo em conta as vantagens do uso do *T. marmorata* enquanto modelo vertebrado na investigação da transmissão colinérgica, apresentava-se como fundamental a necessidade de realizar estudos para avaliar a modulação da actividade nervosa através da activação de receptores nicotínicos utilizando uma resolução temporal de milésimos de segundo.

O objectivo principal deste trabalho centrou-se, então, na caracterização dos mecanismos envolvidos na modulação da transmissão colinérgica rápida por receptores nicotínicos pré-sinápticos. Pretendia-se identificar alvos envolvidos no processo neurosecretor de ACh, como os nAChRs pré-sinápticos, bem como a participação de moléculas (e.g. Ca^{2+}) capazes de influenciar essa mesma modulação. Também foi objectivo do presente trabalho analisar a influência da activação dos receptores nicotínicos pré-sinápticos na elevação transitória dos níveis de Ca^{2+} no terminal nervoso e da sua relação espacial relativamente aos locais de libertação de ACh e aos próprios receptores nicotínicos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem do tecido biológico

3.1.1 Captura e manutenção dos espécimes experimentais

As amostragens foram realizadas em dois locais diferentes: na Ria Formosa – uma zona costeira protegida no sotavento algarvio (Gonçalves & Beldade, 2000) e ao largo da Póvoa do Varzim, na costa norte portuguesa. Os espécimes foram capturados por pescadores locais, por redes de arrasto, entre os meses de Fevereiro a Dezembro de 2009. Foram capturados 16 indivíduos de *T. marmorata* de ambos os sexos, na sua maioria fêmeas, com comprimento total compreendido entre 15 a 60 cm.

Após a sua captura na Ria Formosa, os peixes eram rapidamente transportados em contentores apropriados com água do mar, para o PRODED da Universidade do Algarve. Aqui, os espécimes foram acondicionados em tanques de produção, num sistema fechado de água do mar filtrada e oxigenada, com fotoperíodo e salinidade naturais, onde a temperatura foi mantida a 15°C com o auxílio de um sistema de refrigeração.

Após um período de aclimação ao cativeiro, os indivíduos foram acondicionados num contentor sob condições apropriadas ao seu transporte. O contentor possuía acumuladores de frio, para manter a temperatura nos 15°C; os animais foram colocados em sacos plásticos contendo água do mar, sob ligeira pressão de oxigénio e carvão activado, para eliminar resíduos excretados pelo peixe. Os animais foram transportados para o Laboratório de Engenharia Aquática – Departamento de Produção Aquática, ICBAS, Universidade do Porto. O pescado proveniente da Póvoa do Varzim foi transportado directamente para este local em contentores contendo água do mar. No ICBAS, os tanques de cativeiro possuíam uma capacidade de 130 Litros e continham água do mar filtrada e oxigenada, em sistema fechado e condições artificiais (fotoperíodo: 10 horas de luz e 14 horas de escuro; temperatura: 15°C ± 3°C).

Durante o período de cativeiro, os animais recusaram todo o tipo de alimentação fornecida (ração e alimento vivo). Os parâmetros da qualidade da água (% saturação de oxigénio, pH, nitritos, nitratos e amónia) foram analisados duas vezes por semana; a temperatura foi determinada diariamente. Os resíduos libertados para a água foram removidos por sifonação e quando se efectuava a renovação de 70% da água dos tanques.

3.1.2 Preparação do meio de Krebs para *Torpedo*

A solução salina fisiológica para elasmobrânquios (Krebs *Torpedo*) possuía a seguinte composição: 280 mM NaCl; 3 mM KCl; 2,7 mM MgCl₂; 5 mM NaHCO₃; 300 mM Ureia; 5,55 mM Glucose; 20 mM Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-etanossulfônico (HEPES); 3,4 mM CaCl₂ – Sigma-Aldrich). Após a sua homogeneização com água destilada e desionizada, o meio foi oxigenado com 95% de O₂ e 5% de CO₂ durante 10 minutos. Posteriormente o seu pH foi ajustado entre 7,0 e 7,1 com NaOH.

Esta solução salina foi utilizada como meio de limpeza e manutenção do tecido biológico, de modo a permitir a manutenção e as propriedades estruturais e funcionais do tecido electromotor do *Torpedo* por mais de 40 horas (Dunant *et al.*, 1972 e 1980).

3.1.3 Eutanásia e isolamento do órgão eléctrico de *T. marmorata*

Para a dissecação e isolamento do órgão eléctrico, o animal foi anestesiado por imersão em água do mar contendo Tricaína (MS-222 ou sal 3-aminobenzoato metanosulfonato, Sigma), na proporção de 1g Tricaína: 3L de água do mar. Neste processo é importante assegurar que o nível de stress não aumente devido à mudança de ambiente. Aguardou-se até os movimentos respiratórios dos espiráculos terem cessado, e até a ausência completa de resposta reflexa por parte do animal aos estímulos mecânicos de compressão num dos raios da barbatana caudal.

A escolha do anestésico usado baseou-se nos resultados descritos por Dunant *et al.* (1980), onde se observou que uma breve anestesia com Tricaína não possuía efeitos na neurotransmissão da electroplaca, e que o efeito desta substância era rapidamente revertido pela lavagem do tecido.

De acordo com as normas éticas respeitantes ao bem-estar animal (Decreto de Lei n°129/92, Portaria 1005/92) procedeu-se à eutanásia do espécime por exsanguinação. O procedimento seguinte consistiu na descerebração, realizando-se dois cortes no tronco cerebral, de maneira a impedir a transmissão de informação para a periferia.

Após a localização táctil do órgão eléctrico, através da diferença de textura da pele e da palpação da cartilagem que o envolve, os órgãos foram extraídos mediante a realização de 3 cortes, como se pode verificar na figura 4.

O órgão eléctrico excisado contém resíduos da operação e pele em ambas as faces, ventral e dorsal. Para não comprometer a viabilidade do tecido, este tem de ser imediatamente colocado num recipiente contendo meio de Krebs *Torpedo*. Esta pré-

incubação permite ao tecido recuperar do processo de isolamento. O tecido é posteriormente dividido em porções mais pequenas, para facilitar o seu manuseamento; os resíduos provenientes do processo de extracção e a pele envolvente são eliminados.



Figura 4: Dissecção do órgão eléctrico através de 3 tipos de cortes. Exemplificação do 1º corte (linha vermelha, na figura 4a), e do 2º corte (linhas amarelas, na figura 4a) e a execução do 3º corte, a remoção do órgão (figura 4b).

Após a realização dos procedimentos iniciais, procedeu-se à dissecção cuidadosa de pequenos fragmentos do tecido, de modo a isolar sem danificar as unidades estruturais e funcionais do órgão eléctrico – os prismas. Os prismas são colunas com aproximadamente 500 electrócitos sobrepostos, que são dispostos lado a lado no órgão. Após a sua dissecção, os prismas isolados são poliedros de 2-3 mm de diâmetro, pesando entre 40 a 350 mg de acordo com o tamanho do *T. marmorata*. O material biológico foi armazenado no meio de Krebs *Torpedo* no frigorífico a 4°C.

3.2 Metodologia electrofisiológica

3.2.1 Sistema de estimulação e avaliação da actividade eléctrica dos prismas

O sistema electrofisiológico (figura 1, Anexo I) é constituído pelos seguintes equipamentos: bomba peristáltica, tubos de perfusão, aparelho de estimulação de prismas e registo de potenciais do órgão eléctrico de *Torpedo marmorata* (referenciado no texto como aparelho de estímulo-registo), rede, eléctrodos de registo e de estimulação eléctrica de campo, estimulador eléctrico, unidade de isolamento de estímulos, digitalizador e sistema informatizado de aquisição de sinais.

A bomba peristáltica (Gilson Medical Electronics) regula a velocidade do fluxo do meio de Krebs *Torpedo*; o fluxo de perfusão foi regulado para valores de 0,5 a 1 mL/min. Uma das extremidades de cada tubo da bomba foi imersa em meio de Krebs *Torpedo*, e a outra foi colocada próximo dos prismas para que se estabeleça a perfusão

dos mesmos. Deste modo, os prismas são perfundidos de forma directa, lenta e contínua para se evitar a perda de características fisiológicas do tecido ao longo da experiência.

O aparelho de estímulo-registo (figura 5) possui oito canais de estímulo-registo e dois botões que permitem escolher o canal a estimular/registar. Para facilitar a leitura dos potenciais, cada canal tem incorporado dois reguladores de polaridades, um de detecção e outro de estimulação.



Figura 5: Imagem do aparelho estímulo-registo de prismas de *Torpedo marmorata*.

Neste aparelho, os prismas são fixados a uma rede humedecida com meio salino (Krebs *Torpedo*), de forma a facilitar a passagem da corrente eléctrica através da condução das cargas. Esta rede possui dois eléctrodos de platina colocados paralelamente ao comprimento do prisma, que foram especialmente desenhados para estimulação eléctrica de campo. A fixação dos prismas à rede é realizada através dos eléctrodos de registo (também de platina). Estes devem ser colocados nas extremidades dos prismas, de modo a integrar os EPPs de todos os electrócitos desse prisma.

O sinal bioeléctrico gerado nos prismas passa pelo digitalizador que, não só envia a informação obtida para o computador, como também permite regular a linha de base e atenuar o sinal se necessário. Para redução de ruídos eléctricos externos, o sistema possui várias linhas-terra dispersas. No computador, o registo é lido através do programa *Ophiuchus* versão 1.1 (Sebastien Andrivet, Universidade de Genebra), onde são introduzidas as características da aquisição (frequência – 50 kHz; taxa de aquisição – 20 μ s; duração – 50 ms). Nesta primeira análise é possível verificar o estado do tecido biológico e a existência de erros de estímulo-registo (eléctrodos e/ou prismas mal colocados, por exemplo). Os parâmetros dos dados registados são analisados posteriormente com o WinWPC V.4.0.8 (John Dempster, software da Universidade de Strathclyde).

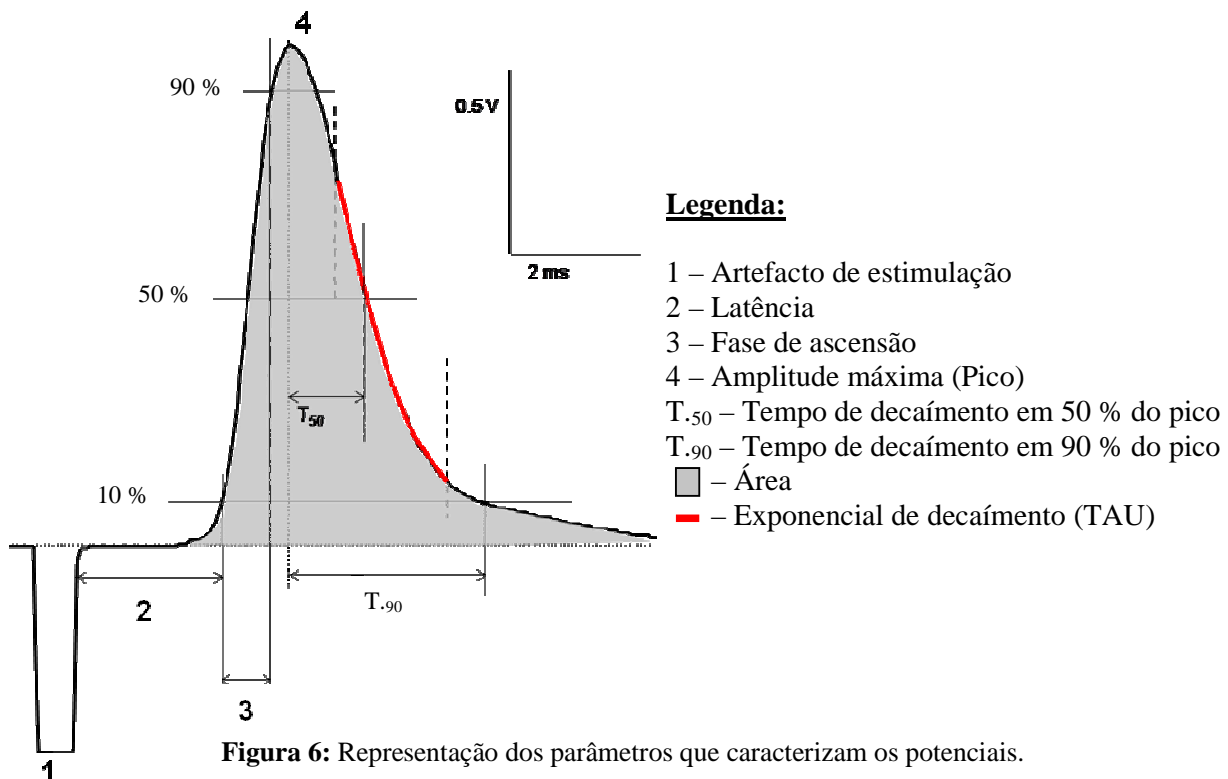
3.2.2 Condições gerais da estimulação e avaliação da actividade eléctrica dos prismas

Para a realização das experiências é necessário colocar os prismas à temperatura ambiente com a antecedência de pelo menos 1 hora. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente (18-22°C).

Nas experiências onde se procedeu a mudanças de composição do meio salino ($\pm\text{Ca}^{2+}$) ou à adição de antagonistas nicotínicos (DH- β -E; HE), o período de pré-incubação do tecido nas novas condições foi de pelo menos 1 hora, para se garantir uma completa difusão do meio contendo as novas condições para a biofase do tecido.

O tipo e características do estímulo a aplicar aos prismas é definido no estimulador eléctrico (Multifunction Solid-state square pulse stimulator - Model S88 Stimulator, Grass Medical Instruments). Neste trabalho, usaram-se estímulos supramáximos constituídos por pulsos duplos, com 100 V aplicados durante 500 μs e com 20 ms de intervalo entre eles (correspondendo a uma frequência de 50 Hz). Este procedimento excita apenas os nervos ramificados na superfície dos prismas, já que os electrócitos não são capazes de produzir potenciais de acção regenerativos. A excitação nervosa leva à libertação de ACh, que dará origem à geração de potenciais de electroplaca nos prismas.

3.2.3. Características dos Potenciais de Electroplaca analisados



Nas respostas electrofisiológicas obtidas através dos prismas observaram-se as seguintes características nos Potenciais de Electrolaca resultantes da estimulação eléctrica de campo, (figura 6).

3.2.3.1. Latência: A latência corresponde ao período de tempo entre o artefacto de estimulação e o início do potencial (10% da amplitude máxima).

O período de latência compreende: a excitação do axónio, a condução do impulso até ao terminal pré-sináptico, a entrada de iões Ca^{2+} através da abertura dos CCSV nos terminais, a libertação de ACh para a fenda sináptica e a activação de nAChR pós-sinápticos (sobretudo entrada de Na^+)

3.2.3.2. Fase de ascensão: Esta fase reflecte a activação sincronizada dos nAChR em múltiplas sinapses presentes no prisma que desencadeiam potenciais locais que se somam. Este parâmetro é calculado através da diferença entre 10% e 90% do pico de amplitude.

3.2.3.3. Amplitude máxima (Pico): Esta característica dependente da soma dos potenciais de placa e é muito variável entre prismas, pois depende do tamanho do prisma, posição dos eléctrodos, a precisão na sua dissecção, etc. Este parâmetro corresponde ao maior número de receptores nicotínicos pós-sinápticos activados simultâneamente, pela ligação das moléculas de ACh libertadas pelos terminais colinérgicos.

3.2.3.4. Área: Este é um parâmetro integrado, inferindo sobre a duração do potencial e a quantidade de ACh libertada.

3.2.3.5. Fase de decaimento: A fase de decaimento (fase entre 75% e 15% da amplitude do potencial), no qual se analisa o tempo de decaimento através do $T_{50\%}$ e $T_{90\%}$ (tempo de decaimento em 50% e 90% do pico, respectivamente) e da sua exponencial (TAU). Nesta fase, a AChE degrada a ACh e os nAChR pós-sinápticos são inactivados.

3.3 Bioluminescência

3.3.1 Preparação de sinaptossomas de órgão eléctrico de *Torpedo marmorata*

Este método consiste no isolamento e purificação de terminais nervosos pré-sinápticos (figura 7). As soluções necessárias à realização deste protocolo (tabela 1) foram preparadas previamente e colocadas imediatamente após a sua preparação no frigorífico a 4°C.

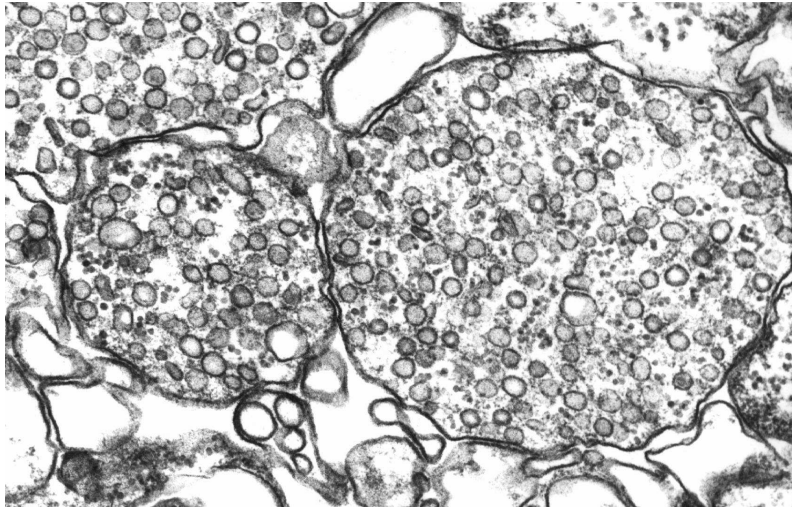


Figura 7: Fotografia de microscopia electrónica de sinaptossomas do órgão eléctrico de *Torpedo marmorata* (x 60.000), adaptado de Morel *et al.*, 1977).

Tabela 1: Composição das soluções necessárias para isolamento de sinaptossomas do órgão eléctrico de *Torpedo marmorata* (todos os fármacos utilizados são da Sigma-Aldrich).

Solução I	Quantidade para 100 mL:
Glucose 11 mM	0,2 g
KCl 6 mM	0,6 mL de solução a 1 M
MgCl ₂ 3,6 mM	0,36 mL de solução a 1 M
NaHCO ₃ 6 mM	0,6 mL de solução a 1 M
Na ₂ HPO ₄ 100 mM	20 mL de solução a 0,5 M
NaH ₂ PO ₄ 100 mM	20 mL de solução a 0,5 M
H ₂ O	Perfazer até 100 mL
Krebs 0	Quantidade para 100 mL:
NaCl	1,64 g
Ureia	1,8 g
Solução I	50 mL
H ₂ O	Perfazer até volume final de 100 mL
Krebs 0,3	Quantidade para 20 mL:
NaCl	0,33 g
Sacarose	2,05 g
Solução I	10 mL
H ₂ O	Perfazer até volume final de 20 mL
Krebs 0,5	Quantidade para 20 mL:
NaCl	0,21 g
Sacarose	3,42 g
Solução I	10 mL
H ₂ O	Perfazer até volume final de 20 mL
Krebs 0,7	Quantidade para 20 mL:
NaCl	0,1 g
Sacarose	4,8 g
Solução I	10 mL
H ₂ O	Perfazer até volume final de 20 mL

Inicialmente incubou-se 16g de tecido proveniente dos órgãos eléctricos em Krebs *Torpedo* sem Ca^{2+} , durante 1 hora, à temperatura ambiente (~20-22°C). Após a limpeza e secagem do tecido biológico, procedeu-se à homogeneização do tecido. Esta operação realizou-se com o auxílio de 2 bisturis numa placa de dentista até ao desaparecimento das estruturas. De seguida, colocou-se o homogeneizado em 50 mL da solução Krebs 0 numa placa com agitação magnética. Para manter a temperatura a 4°C, utilizou-se gelo em contacto indirecto até ao final do isolamento.

Utilizaram-se 3 seringas de 100 mL com telas inox de 1000, 500 e 200 μm de diâmetro, de modo a separar os terminais pré-sinápticos dos electrócitos (componente pós-sináptico). A passagem da suspensão por cada tela foi auxiliada através da raspagem do homogeneizado com uma lâmina do bisturi obliquamente à tela. Este processo foi realizado 2 vezes por ordem decrescente de diâmetro da tela num goblé sobre o gelo. A suspensão final foi filtrada por vácuo num Kitazato com suporte Buchner possuindo um filtro com uma tela de nylon de 50 μm de diâmetro. No final, o filtro foi lavado com 20 mL solução Krebs 0.

O filtrado foi centrifugado (centrífuga Sorval de alta velocidade) a 7000 rpm (6000x g) durante 20 minutos (4°C). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento obtido foi ressuspenso em 12 mL de Krebs 0 num balão volumétrico de 25 mL. A solução foi agitada energeticamente durante alguns segundos.

Previamente foram preparados gradientes com as soluções Krebs 0,3, Krebs 0,5 e Krebs 0,7, com o auxílio de uma bomba peristáltica. Nesta operação prepararam-se 6 tubos de centrífuga com 11 mL de capacidade, sobrepondo 2,5 mL de cada solução e adicionando-se no final 2,5 mL do sedimento ressuspenso em Krebs 0. Procedeu-se a uma ultracentrifugação (centrífuga Beckman SW 41) a 22700 rpm durante 40 min (4°C), recolhendo-se de seguida a banda de interesse (C, figura 8) com uma bomba peristáltica.

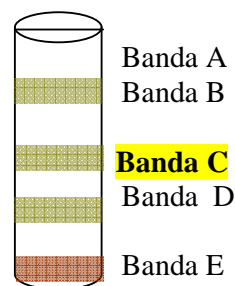


Figura 8: Ilustração esquemática do produto final da última centrifugação, onde estão representadas as bandas A, B (Mielina/ resíduos), C (Sinaptossomas purificados), D (Terminais com axónios), E (sedimento).

Durante a realização deste protocolo a temperatura foi mantida a 4°C. Os sinaptossomas foram armazenados a 4°C até à realização da experiência.

3.3.2 Quantificação da libertação de ACh pelos sinaptossomas

A libertação de ACh foi quantificada por bioluminescência. Este método é vantajoso, por ser um método de quantificação rápido (segundos) e directo que não necessita recorrer ao uso de inibidores de AChE. A quantificação de ACh realizou-se através de uma reacção enzimática em cadeia que degrada a ACh em colina e acetato; a colina é oxidada posteriormente em betaína e H₂O₂, este último oxida o luminol libertando luz (figura 9). A luz libertada pode ser captada através de um luminómetro, cujas emissões podem ser processadas informaticamente. Sabendo que a quantidade de luz gerada é proporcional à quantidade de ACh libertada, foi possível proceder-se à quantificação da libertação de ACh em pmol através do método de padrão externo.

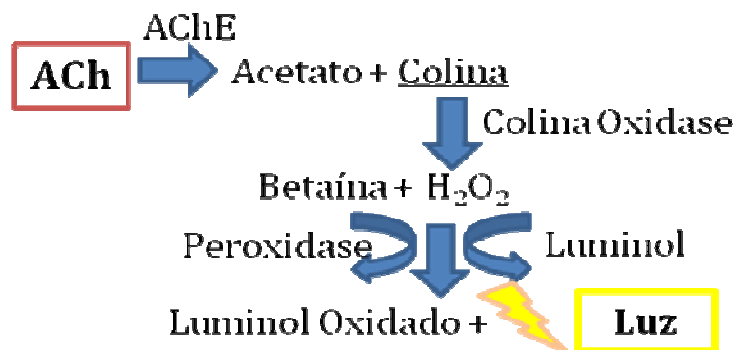


Figura 9: Representação esquemática da reacção enzimática em cadeia que permite quantificar a libertação de ACh através de um método de bioluminescência.

Previamente à realização das experiências foi necessário colocar os sinaptossomas à temperatura ambiente e preparar a solução de leitura da libertação de ACh em sinaptossomas de *Torpedo* (NaCl 280 mM, Sacarose 300 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 1,8 mM, Glucose 5,5 mM, Tris 200 mM, CaCl₂ 3,4 mM – Sigma-Aldrich; pH 8,5). Salienta-se nesta solução a concentração NaCl que é mais elevada do que a utilizada em peixes teleósteos e vertebrados superiores. Estes valores assemelham-se aos encontrados fisiologicamente no plasma dos elasmobrânquios, cuja osmolaridade é muito elevada (Girod *et al.*, 1992).

Adicionou-se a cada tubo de leitura um agitador magnético, 300 µL de solução de leitura e a mistura de enzimas (20 µL de Luminol, 10 µL Peroxidase, 7 µL Colina oxidase). Depois adicionou-se a suspensão dos sinaptossomas e calibrou-se a curva

obtida com curvas-padrão de ACh. De seguida, adicionou-se o agente despolarizante (KCl 40 mM ou Veratridina (VT) 100 μ M) na presença ou ausência do fármaco a ser testado (DMPP e/ou DH- β -E).

3.4. Imagiologia da junção neuro-eléctrica de *T. marmorata*

Nos estudos de microscopia confocal (Olimpus FV1000), os prismas foram incubados durante 24 horas a 4°C em Krebs *Torpedo* contendo α -bungarotoxina-tetrametilrodamina (1,25 μ M), preparado a partir de uma solução-mãe (1,25 mM em DMSO). Desta forma, foi possível marcar especificamente os receptores nicotínicos pós-sinápticos através da ligação da α -bungarotoxina aos receptores nicotínicos contendo sub-unidades $\alpha 1$. O grupo tetrametilrodamina, ligado à α -bungarotoxina, permite a visualização dos receptores nicotínicos que cobrem a superfície ventral dos electrócitos por microscopia confocal de fluorescência (comprimento de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 650 nm).

3.5. Fármacos utilizados

- **α -Bungarotoxina (BTX)** – é um peptídeo que se liga de forma irreversível às sub-unidades $\alpha 1$ dos nAChR pós-sinápticos, o que impede a abertura dos canais iónicos da placa-motora pela ACh, paralisando o alvo. É produzido pela cobra *Bungarus multicinctus*.
- **Tetrodotoxina (TTX)** – É uma potente neurotoxina que bloqueia a geração de potenciais de acção, pois liga-se irreversivelmente aos canais de sódio sensíveis à voltagem, bloqueando-os.
- **Neostigmina** – é um inibidor reversível da enzima AChE.
- **1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide (DMPP)** – Agonista dos nAChR.
- **Veratridina** – é uma neurotoxina que se liga aos canais de Na⁺, activando-os permanentemente. A despolarização do terminal nervoso, activa CCSV que desencadeiam o aumento da concentração intracelular de Ca²⁺.
- **KCl** – O aumento da concentração extracelular de K⁺ inverte o gradiente intra- e extracelular impedindo o efluxo de iões positivos causando, deste modo, a despolarização das células excitáveis.
- **Dihidro- β -eritroidina (DH- β -E)** – É um antagonista competitivo de receptores nicotínicos, com um grau de selectividade para nAChR com sub-unidades $\alpha 3/4\beta 2$ (Chavez-Noriega *et al.*, 1997).

- **Hexametônio (HE)** – Este agente bloqueia nAChR, e é considerado um antagonista não selectivo.
- **1, 2 - bis (2 - aminofenoxi)etano - N, N, N', N' - ácido tetraacético acetoximetil ester (BAPTA-AM)** – É uma molécula que se acumula intracelularmente após clivagem do seu grupo éster-AM por esterases endógenas, sendo um agente quelante rápido de Ca^{2+} .
- **etileno glicol - bis (2 - aminoetileter) etano - N, N, N', N' - ácido tetraacético acetoximetil ester (EGTA-AM)** – É também uma molécula que se acumula intracelularmente após clivagem do seu grupo éster-AM por esterases endógenas, mas é um agente quelante lento de Ca^{2+} .

3.6. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média (SEM), correspondente a um número n de experiências. A significância estatística dos resultados obtidos foi avaliada pelo teste t de Student, no qual foram consideradas diferenças estatisticamente significativas sempre que $P < 0,05$. Valores de *, ** $P < 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre o valor obtido na presença do agonista nicotínico (DMPP) e o controlo (*) ou entre o valor obtido na presença do DMPP e o antagonista nicotínico usado (**).

IV. RESULTADOS

4.1. Microscopia de fluorescência

A fluorescência vermelha, observada na figura 10, foi obtida através de fluoróforo de cor vermelha - tetrametilrodamina ligada covalentemente à α -bungarotoxina (antagonista dos nAChR contendo sub-unidades $\alpha 1$).

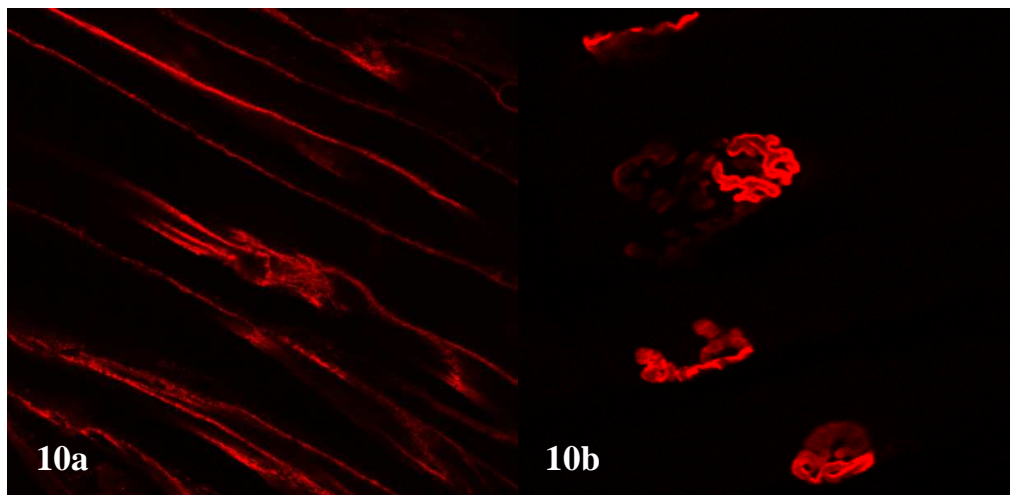


Figura 10: Fotografias de microscopia confocal de fluorescência (BTX – tetrametilrodamina) de electróitos de *Torpedo* (10a) e da junção neuromuscular de rato (10b) (ampliação: 400x).

A partir destas imagens é possível observar diferenças entre as duas preparações. Na figura 10a, os nAChR estão dispersos ao longo da superfície ventral dos electróitos, enquanto na JNM de rato estes estão localizados em regiões especializadas - placas motoras (figura 10b). Os electróitos de *Torpedo*, que estão representados na figura 10a, possuem 15 μm \varnothing e 1-2 mm de largura.

4.2. Dados electrofisiológicos

4.2.1. Efeito do agonista dos nAChR (DMPP)

Na figura 11 está representado o efeito facilitatório do agonista nicotínico, DMPP (aplicado durante 5 segundos), sobre pares de potenciais de electroplaca num prisma de *T. marmorata*. O efeito facilitatório do DMPP foi avaliado na concentração fisiológica de cálcio (3,4 mM). Verificou-se que para o 1º EPP, a percentagem média de aumento na amplitude foi de 15% e na área de 27%.

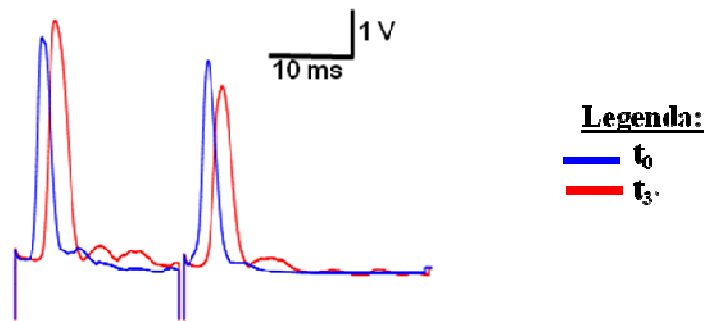
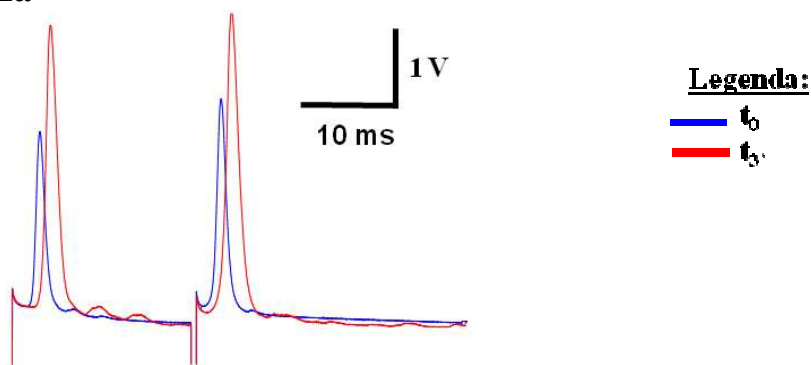
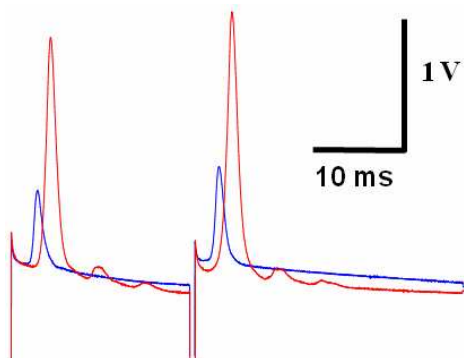


Figura 11: Ilustração gráfica dos potenciais de electroplaca na concentração fisiológica de Ca^{2+} (3,4 mM); a azul está representado o potencial antes da aplicação do DMPP (0,1 μM) e a vermelho o potencial 3 minutos após a sua aplicação.

12a



12b



12c

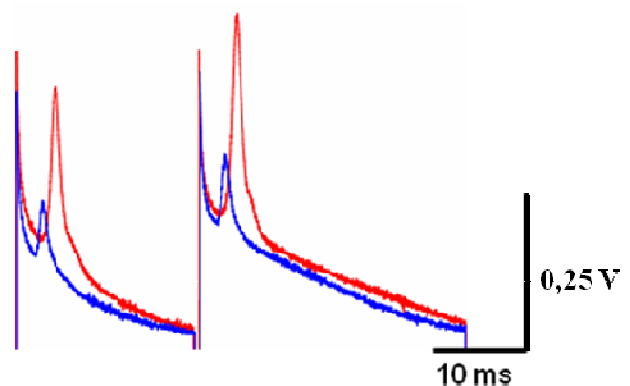


Figura 12: Ilustração gráfica dos potenciais de electroplaca nas diferentes concentrações de Ca^{2+} extracelular: 1,7 mM (figura 12a); 1,275 mM (figura 12b); 0,85 mM (figura 12c). A azul está representado o potencial antes da aplicação do DMPP (0,1 μM) e a vermelho o potencial 3 minutos após a sua aplicação.

Seguidamente procedeu-se à redução da concentração extracelular de Ca^{2+} para 1,7, 1,275 e 0,85 mM (figura 12) com o objectivo de diminuir a margem de segurança da transmissão sináptica neuroeléctrica. Esta estratégia permite tornar mais evidentes pequenas alterações dos potenciais de electroplaca que resultem da variação da

libertação do neurotransmissor. A redução da concentração extracelular de Ca^{2+} tornou mais evidente o efeito facilitatório do agonista nicotínico DMPP sobre os potenciais de electroplaca, sugerindo que este composto possui um efeito predominantemente pré-sináptico. Por exemplo, quando a concentração extracelular de Ca^{2+} foi reduzida de 3,4 mM para 0,85 mM, observou-se um aumento de 37% na amplitude e de 60 % na área do 1º EPP relativamente à situação controlo.

A redução da concentração extracelular de Ca^{2+} permitiu observar o aparecimento do fenómeno de facilitação tetânica, detectado através do aumento da amplitude e duração do 2º EPP comparativamente com o 1º EPP. Este fenómeno não era aparente quando se testou a actividade eléctrica dos prismas usando uma concentração fisiológica de Ca^{2+} (3,4 mM) no meio extracelular. Na figura 12, pode observar-se que o fenómeno de facilitação tetânica também foi significativamente potenciado na presença de DMPP, facto que é concordante com a natureza pré-sináptica da acção do DMPP. Para melhor avaliar este efeito, analisou-se a razão entre as amplitudes do 2º EPP e do 1º EPP, na presença e na ausência do agonista variando as concentrações extracelulares de cálcio (figura 13).

Razão da amplitude 2ºEPP/1ºEPP

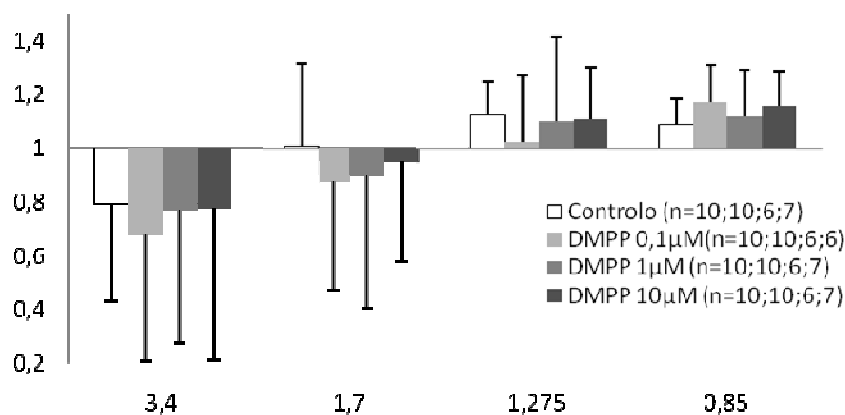


Figura 13: Representação gráfica da razão entre a amplitude do 2º EPP e a do 1º EPP, sob a acção de diferentes concentrações de DMPP (0 – controlo; 0,1; 1; 10 µM), em função de diferentes concentrações de Ca^{2+} extracelular (3,4; 1,7; 1,275; 0,85 mM).

Na presença da concentração fisiológica de cálcio extracelular (3,4 mM) verificou-se que o 2º EPP aparece diminuído relativamente ao 1º EPP para todas as concentrações de DMPP testadas. Relativamente às restantes concentrações de Ca^{2+} extracelular, parece haver uma facilitação no 2º EPP relativamente ao 1º EPP, que foi

exacerbada pelo DMPP quando a concentração extracelular do Ca^{2+} foi reduzida para 0,85 mM. Estes dados, sugerem que o efeito do DMPP na actividade eléctrica do órgão eléctrico do *T. marmorata* tem uma natureza pré-sináptica.

Apesar dos efeitos observados sobre a facilitação tetânica dos potenciais de electroplaca evidenciarem a existência de um efeito facilitatório do DMPP, a análise estatística da amplitude e área do 1º EPP reforça a existência de diferenças significativas entre os EPPs após aplicação de DMPP mesmo quando foi utilizada a concentração fisiológica de cálcio (3,4 mM). De forma semelhante, o efeito facilitatório do DMPP foi consistentemente observado através da avaliação da amplitude e da área do EPP após redução dos níveis extracelulares de cálcio (figuras 14 e 15).

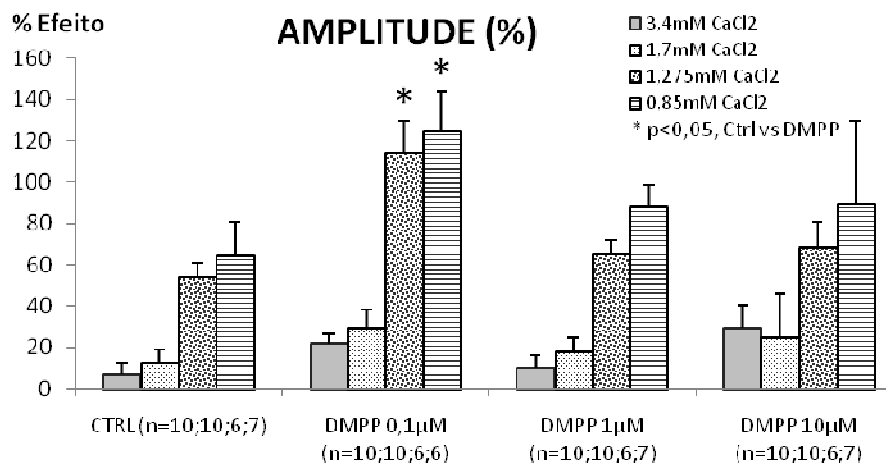


Figura 14: Representação gráfica do efeito do DMPP (0,1-10 μM) sobre amplitude dos potenciais de electroplaca (1º EPP) em função de diferentes concentrações de Ca^{2+} extracelular.

O efeito facilitatório do DMPP sobre a amplitude e a área dos potenciais eléctricos (figura 14 e 15) foi máximo na concentração 0,1 μM . Observaram-se valores médios de aumento na amplitude de 22% (com 3,4 mM Ca^{2+}) e de 124% (com 0,85 mM Ca^{2+}) na presença de DMPP (0,1 μM). Os valores médios obtidos para o aumento da área dos potenciais de electroplaca na presença de DMPP (0,1 μM) foram 44%, 49%, 158% e 179 % quando as concentrações extracelulares de cálcio foram reduzidas de 3,4 mM para 1,7, 1,274 e 0,85 mM, respectivamente. Assim, foi possível verificar uma relação inversa entre o efeito facilitatório do agonista e a concentração extracelular de cálcio.

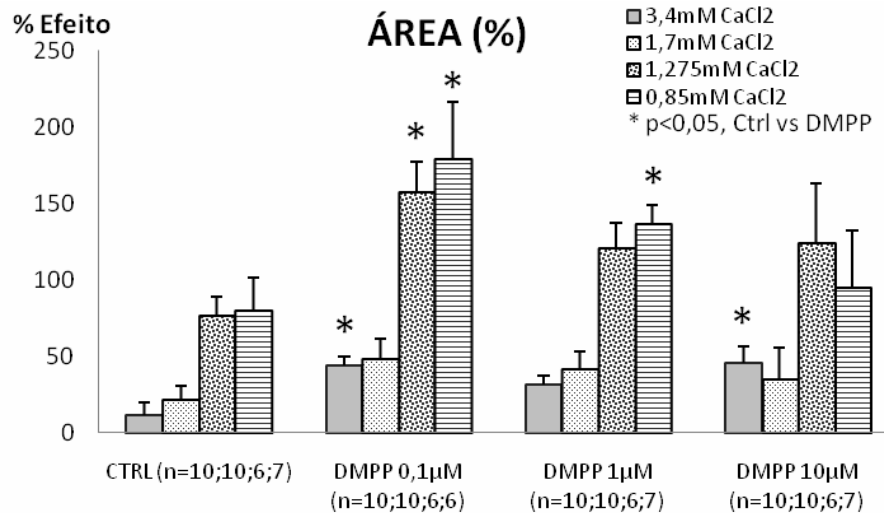


Figura 15: Representação gráfica do efeito do DMPP (0,1-10 μM) sobre a área dos potenciais de electroplaca (1° EPP) em função de diferentes concentrações de Ca^{2+} extracelular.

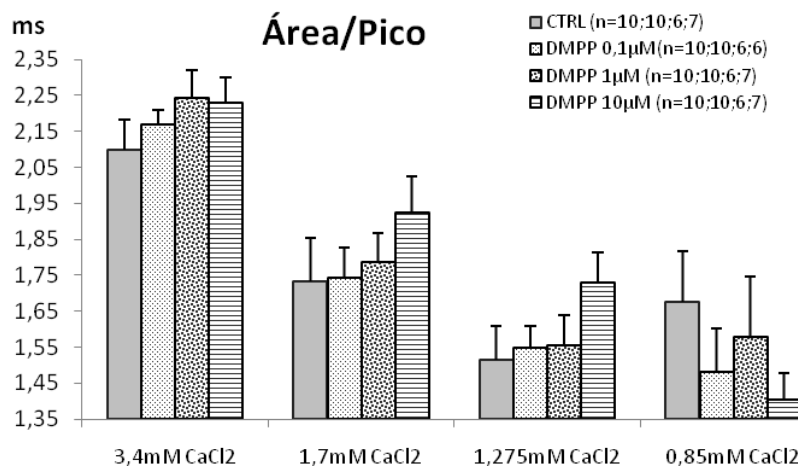


Figura 16: Efeito do DMPP sobre a razão área/pico do 1° EPP em prismas perfundidos com diferentes concentrações de Ca^{2+} extracelular.

Quantificando a razão área/pico dos potenciais de electroplaca, verificou-se que o DMPP aumentou essa razão de forma dependente da concentração; o efeito facilitatório do DMPP foi observado em todas as condições onde se manipulou a concentração extracelular de Ca^{2+} , excepto quando se usou 0,85 mM. Nesta última circunstância existem erros de quantificação devido à reduzida amplitude dos potenciais de electroplaca, que podem influenciar a avaliação dos parâmetros analisados (figura 16). O aumento da área / pico sugere que o DMPP pode exercer os seus efeitos regulando preferencialmente a duração do potencial de electroplaca.

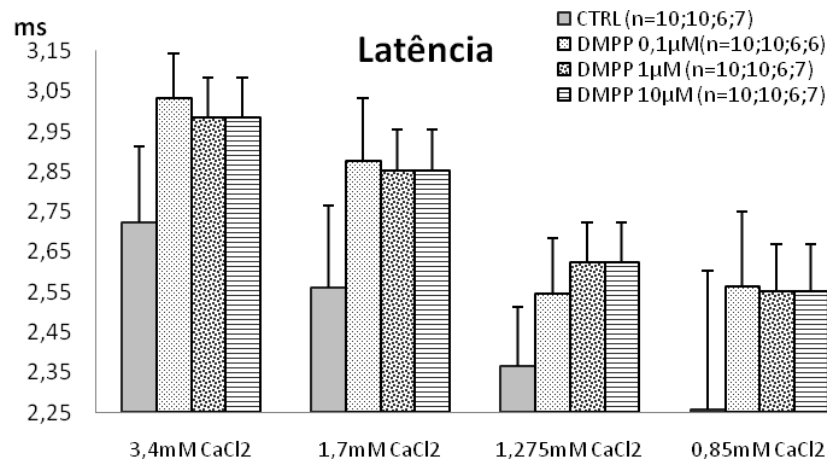


Figura 17: Efeito do DMPP sobre o período de latência do 1º EPP em prismas perfundidos com diferentes concentrações de Ca²⁺ extracelular.

Também relativamente ao período de latência (figura 17), que consiste no intervalo entre a estimulação dos axónios e a libertação de ACh para a fenda sináptica, se verificou que a aplicação de DMPP aumentou este intervalo em cerca de 0,3 ms relativamente ao observado na situação controlo.

Os restantes parâmetros analisados (fase de ascensão, fase de decaimento, T.50%, T.90% e TAU) para os potenciais de electroplaca não foram significativamente ($p > 0,05$) alterados pelo DMPP.

A existência de um efeito tónico mediado pela ACh libertada endogenamente sobre a amplitude dos potenciais de electroplaca que é capaz de explicar a facilitação tetânica medida pela razão 2º EPP / 1º EPP (ver figura 13), foi testada incubando os prismas com dois antagonistas dos receptores nicotínicos, a DH-β-E (3 µM) e o HE (100 e 1000 µM), nas 24 horas precedentes à realização das experiências (figura 18). A DH-β-E (3 µM) e o HE (1000 µM) preveniram a facilitação tetânica observada quando os prismas foram incubados com um solução de Krebs *Torpedo* contendo 1,275 mM de CaCl₂. Uma vez que o efeito da DH-β-E foi detectado para uma concentração (3 µM) inferior à necessária para que se observasse o bloqueio da facilitação tetânica na presença de HE (1000 µM), os resultados sugerem a presença de sub-unidades α3/4β2 sensíveis à DH-β-E na composição do receptor responsável pela autofacilitação nicotínica no órgão eléctrico de *T. marmorata*.

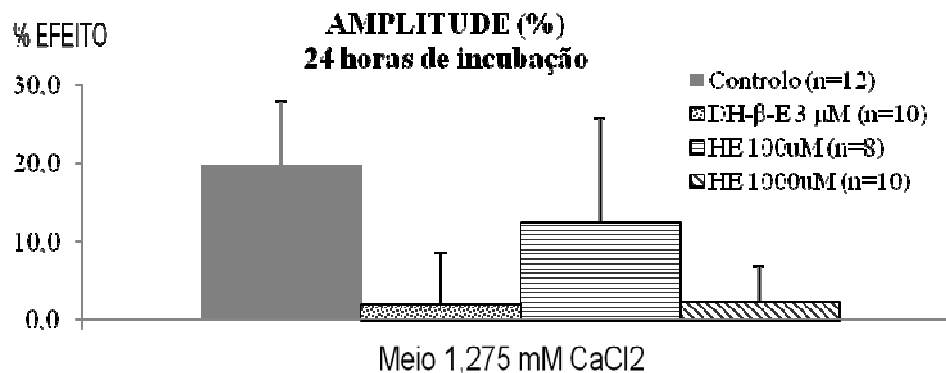


Figura 18: Efeito dos antagonistas dos receptores nicotínicos, DH-β-E (3 μM) e HE (100-1000 μM), sobre a facilitação tetânica dos potenciais de electroplaca em prismas perfundidos com uma solução de Krebs *Torpedo* contendo 1,275 mM de Ca²⁺.

4.2.2. O efeito do DMPP é pré- ou pós-sináptico?

Apesar de se ter verificado que o efeito facilitatório do DMPP, sobre os potenciais de electroplaca, aumenta com a redução da margem de segurança da transmissão sináptica através da redução extracelular do Ca²⁺ e que este composto potenciava a facilitação tetânica nestas condições experimentais, subsistia a dúvida sobre qual dos dois componentes sinápticos, pré- ou pós-sináptico, seria mais afectado pelo DMPP. Para esclarecer esta dúvida, realizaram-se experiências onde a geração do impulso nervoso foi bloqueada com TTX (1 μM), uma toxina que inibe selectivamente canais de sódio sensíveis a voltagem. Nestas experiências adicionou-se ainda um inibidor da AChE, neostigmina (20 μM), para evitar a degradação da ACh aplicada exogenamente às preparações e, assim, permitir comparar o seu efeito com o do DMPP nas mesmas condições experimentais.

A aplicação de ACh (100 μM) na presença de TTX (1 μM) e neostigmina (20 μM) causou um aumento significativo (>100 mV) do potencial de electroplaca (n=4) que se manteve durante alguns segundos. Contrariamente, o DMPP (100 μM) foi desprovido de qualquer resposta sobre a actividade dos electrócitos (n=4) (figura 19), confirmando a suspeita de que o seu efeito facilitatório é mediado exclusivamente pela activação dos receptores nicotínicos pré-sinápticos.

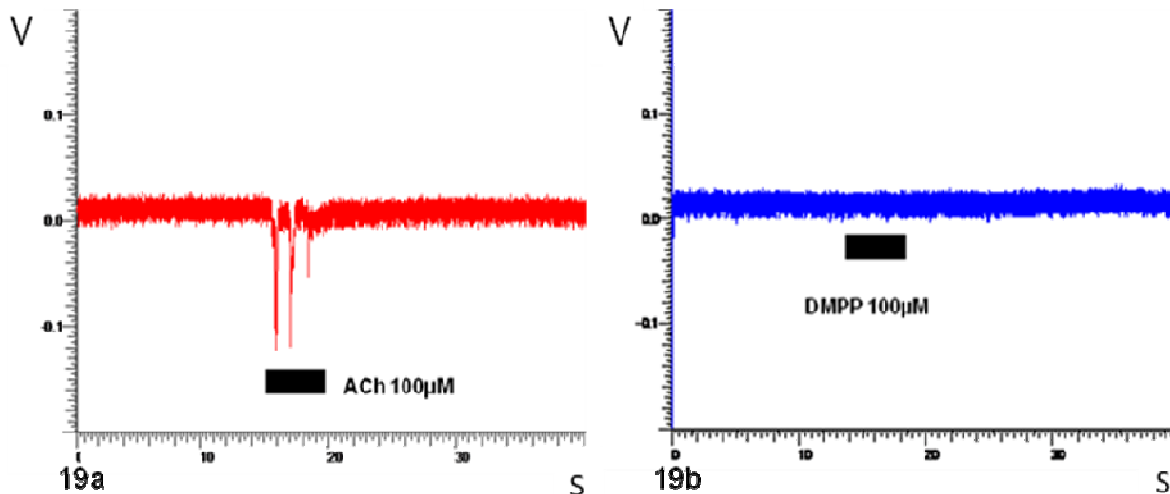


Figura 19: Potenciais pós-sinápticos observados após a adição de ACh (19a) ou DMPP (19b) em prismas pré-incubados com TTX (1 μ M) e neostigmina (20 μ M).

4.3. Dados de bioluminescência (sinaptossomas)

4.3.1. Sinaptossomas despolarizados pela veratridina: Efeito do DMPP e seu antagonismo pela DH- β -E

A figura 20 representa valores de bioluminescência proporcionais à liberação de ACh em função do tempo a partir de terminações nervosas isoladas (sinaptossomas) do órgão eléctrico do *T. marmorata* despolarizadas com veratridina, na ausência e na presença de DMPP. É possível verificar que o DMPP (1 μ M) facilita a liberação de ACh quando os sinaptossomas foram despolarizados com veratridina, e que o seu efeito foi significativamente atenuado pelo antagonista nicotínico, DH- β -E (3 μ M). A figura 21 representa o tratamento estatístico dos resultados obtidos em 4-5 experiências individuais, onde a concentração de ACh (pmol) foi estimada pelo método de padrão externo.

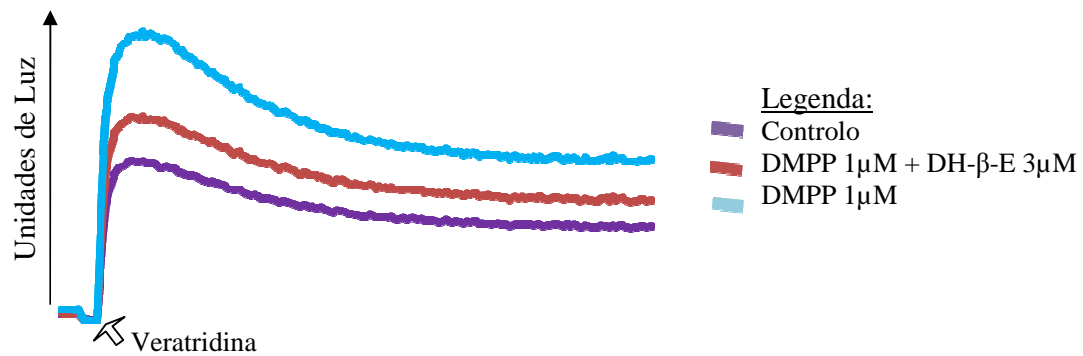


Figura 20: Curvas de bioluminescência (libertação de ACh) em função do tempo a partir de terminações nervosas isoladas (sinaptossomas) do órgão elétrico do *T. marmorata* despolarizadas com veratridina (100 µM), na ausência e na presença de DMPP. Também se representa o efeito do bloqueio dos receptores nicotínicos com DH-β-E. A curva controlo representa a resposta obtida apenas na presença de veratridina com uma concentração fisiológica de Ca^{2+} extracelular.

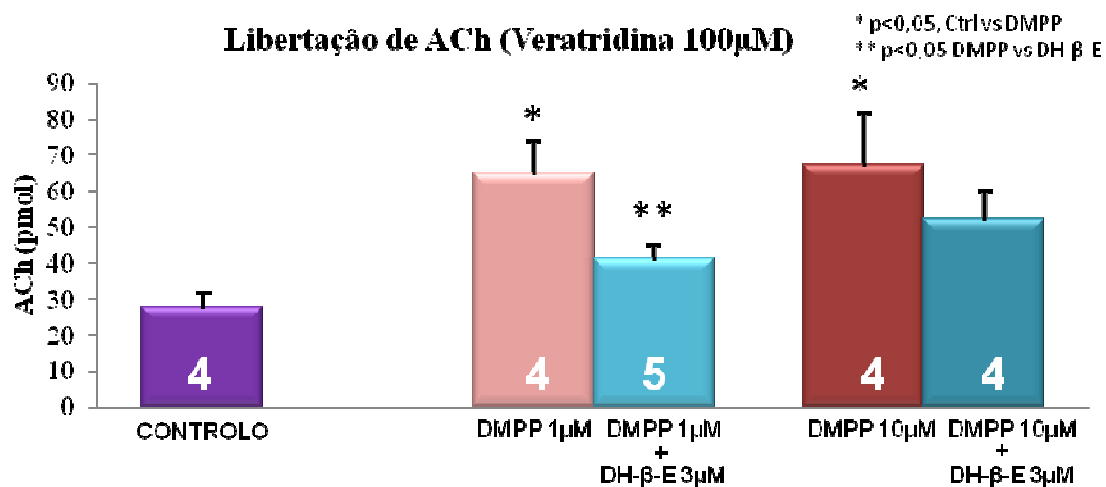


Figura 21: Valores de liberação de ACh a partir de terminações nervosas isoladas (sinaptossomas) do órgão elétrico do *T. marmorata* despolarizadas com veratridina (100 µM), na ausência e na presença de DMPP e/ou de DH-β-E. O valor controlo representa a resposta obtida apenas na presença de veratridina com uma concentração fisiológica de Ca^{2+} extracelular. Os números a branco correspondem ao n das experiências.

4.3.2. Sinaptossomas despolarizados pelo KCl: Efeito do DMPP e seu antagonismo pela DH-β-E

Usando elevadas concentrações de KCl (40 mM) como agente despolarizante dos sinaptossomas (figura 22), foi possível observar o efeito facilitatório do DMPP (1-10 µM) e o seu antagonismo pela DH-β-E (3 µM). O antagonismo pela DH-β-E foi observado mesmo quando se utilizou uma concentração inferior do antagonista (1 µM)

(dados não representados; n=12). Estes resultados confirmam inequivocamente que o efeito facilitatório do DMPP sobre a transmissão sináptica no órgão eléctrico do *T. marmorata* se deve à activação de receptores nicotínicos localizados nos terminais nervosos, que são responsáveis pelo aumento dos níveis de ACh na fenda sináptica.

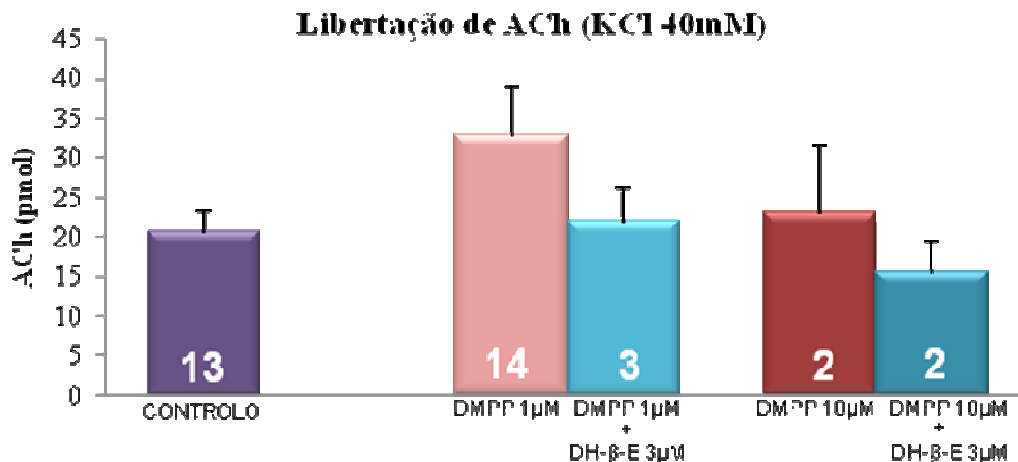


Figura 22: Representação gráfica da libertação de ACh (pmol) na presença de KCl e o efeito do agonista e antagonista (DH-β-E), na concentração fisiológica de Ca^{2+} extracelular (3,4 mM). Os números a branco correspondem ao n das experiências.

Os resultados obtidos nas experiências com sinaptossomas mostraram que o DMPP, aplicado isoladamente, não é capaz de causar a libertação de ACh (dados não mostrados). No entanto, a activação de receptores nicotínicos pré-sinápticos facilita a libertação de ACh resultante da despolarização dos terminais nervosos isolados pela veratridina ou pelo potássio.

4.4. Efeito de agentes quelantes rápidos e lentos de Ca^{2+} intracelular

A facilitação da libertação de neurotransmissores depende em grande medida da regulação dos níveis de Ca^{2+} no interior do terminal nervoso e da sua distribuição junto das zonas activas de libertação. Na figura 23, observa-se que a incubação dos prismas com dois agentes quelantes de Ca^{2+} intracelulares, EGTA-AM (50 µM, quelante lento) ou BAPTA-AM (50 µM, quelante rápido) afectou distintamente a amplitude dos potenciais de electroplaca ao longo do tempo. Um grupo de prismas controlo foi mantido em Krebs *Torpedo* ao longo do tempo, não tendo sofrido alterações significativas na amplitude. Pelo contrário, verificou-se um aumento de amplitude (relativamente ao tempo 0, sem agente quelante) em prismas incubados 60 min com EGTA-AM (50 µM). Esse aumento permaneceu constante ao longo do tempo. No

entanto, os prismas incubados com BAPTA-AM (50 μM) sofreram uma diminuição progressiva da amplitude dos potenciais ao longo do tempo (figura 23), evidenciando que a presença de agentes quelantes lentos (EGTA) ou rápidos (BAPTA) dentro do terminal sináptico afectam a neurotransmissão de maneira diferente.

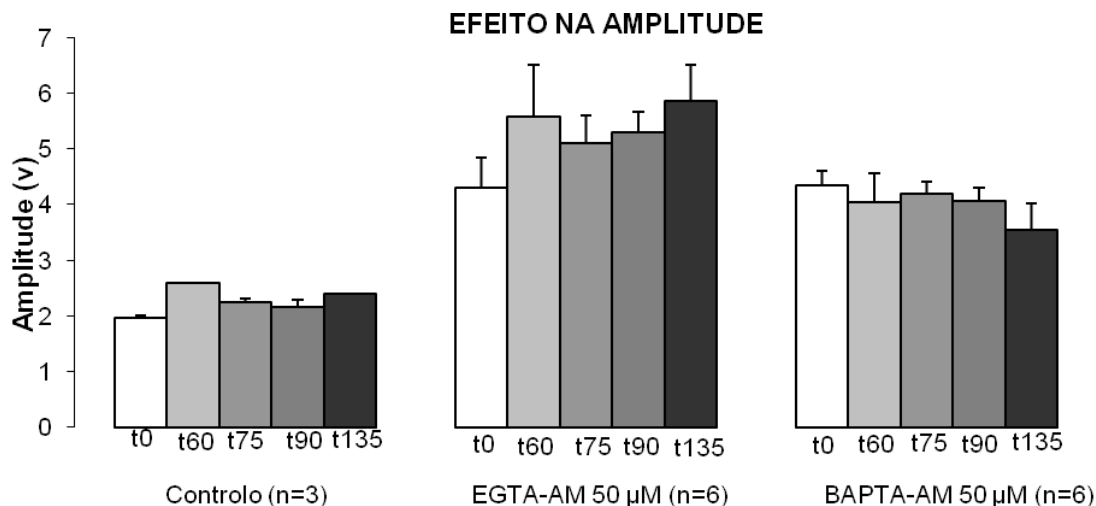


Figura 23: Efeito do quelante rápido (EGTA-AM 50 μM) ou lento (BAPTA-AM 50 μM) do Ca^{2+} intracelular na amplitude dos potenciais de electroplaca isolados do órgão eléctrico de *T. marmorata*.

Na figura 24, pode verificar-se que o efeito facilitatório do DMPP sobre a amplitude dos potenciais de electroplaca foi significativamente atenuado na presença de ambos os agentes quelantes intracelulares do Ca^{2+} testados, EGTA-AM (50 μM , quelante lento) e BAPTA-AM (50 μM , quelante rápido). O efeito preventivo de ambos os agentes, EGTA-AM e BAPTA-AM, foi equipotente.

Devido à duração prolongada destas experiências, necessária para garantir a penetração dos compostos na biofase dos prismas, controlou-se a actividade eléctrica dos prismas nos tempos $t=0$ e $t=150$ min. Como não foram observadas diferenças significativas entre as duas determinações, optou-se por mostrar na figura 24 a análise resultante do efeito dos fármacos ao fim de 150 min de contacto com a preparação.

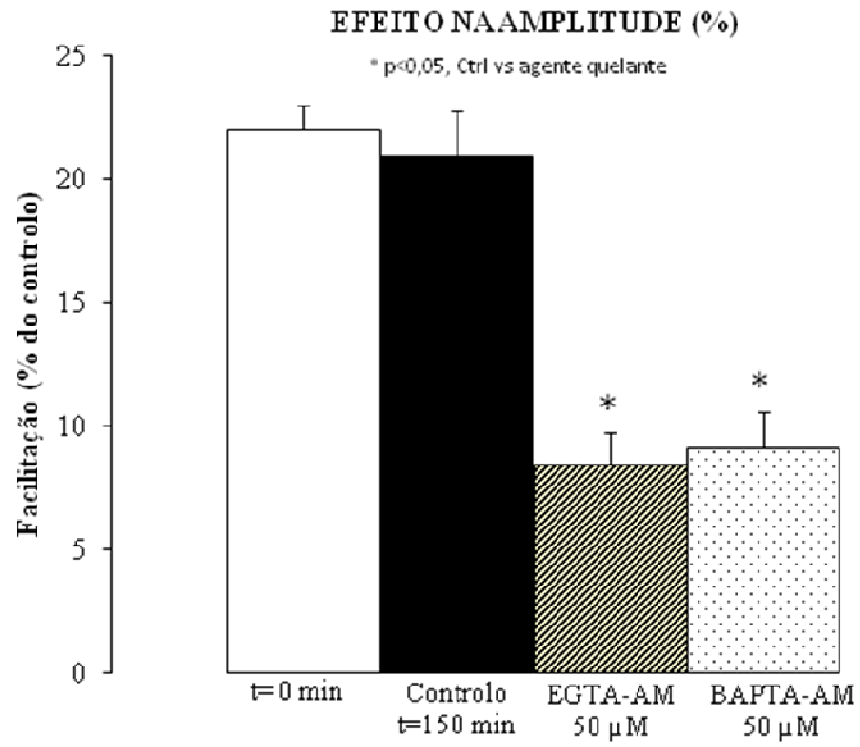


Figura 24: Efeito facilitatório do DMPP (0,1µM) sobre a amplitude dos potenciais de electroplaca em prismas incubados na presença de agentes quelantes do Ca^{2+} .

V. DISCUSSÃO

Neste trabalho estudou-se o efeito modulador causado pela activação de autoreceptores nicotínicos sobre a libertação de ACh nas sinapses do órgão eléctrico de *Torpedo marmorata* e a sua relação com os níveis intra- e extracelulares de Ca^{2+} .

Utilizando um agonista dos receptores nicotínicos, o DMPP, verificou-se que este composto aumenta a latência, a amplitude, a área e a duração (medida através do aumento da razão área/pico) dos potenciais de electroplaca, efeito esse que foi exacerbado à medida que se reduziu a margem de segurança da transmissão sináptica através da diminuição do conteúdo em Ca^{2+} no meio de incubação, de uma situação próxima da fisiológica (3,4 mM) até níveis de 0,85 mM. Estimulando os prismas com pulso duplo a 50 Hz (20 ms intervalo entre estímulos) observaram-se fenómenos de depressão tetânica (observada com 3,4 mM CaCl_2) e de facilitação tetânica (observada após abaixamento do Ca^{2+} extracelular), em prismas controlo, através do cálculo da razão da amplitude do 2º EPP sobre a amplitude do 1º EPP. Também nestas circunstâncias, o DMPP causou um aumento da depressão na presença de Krebs contendo 3,4 e 1,7 mM CaCl_2 , parecendo aumentar o efeito facilitatório para concentrações de cálcio extracelular mais baixas. O efeito facilitatório do DMPP no primeiro EPP foi significativamente atenuado na presença de dois antagonistas nicotínicos, a DH- β -E e o HE, sendo o primeiro mais eficiente na prevenção da acção do DMPP. Os resultados das experiências de electrofisiologia realizadas em prismas isolados do órgão eléctrico de *Torpedo marmorata* sugerem que o DMPP exerce um efeito facilitatório sobre a libertação de ACh activando receptores nicotínicos pré-sinápticos contendo sub-unidades $\alpha 3/4\beta 2$ sensíveis à DH- β -E.

Os mecanismos de modulação pré-sináptica da neurotransmissão dependem de factores relacionados com a actividade do terminal nervoso, como a disponibilidade de ACh nos reservatórios citoplasmáticos e vesiculares e os níveis de Ca^{2+} atingidos no interior do terminal. No *Torpedo* foram identificadas várias sub-populações de vesículas sinápticas (figura 25). As dimensões das vesículas sinápticas presentes no terminal nervoso permitiram a sua diferenciação em diversas sub-populações (Van der Kloot, 2003). Na população de vesículas 0 (VP0), estas possuem um diâmetro de cerca 54 nm (Brochier *et al.*, 1991). As vesículas VP0 são produzidas no corpo celular e, posteriormente, transportadas ao longo do axónio até ao terminal nervoso. Durante o

transporte, estas vesículas podem sofrer alterações no seu conteúdo em ACh (Van der Kloot, 2003).

As vesículas que compõem a sub-população com maior diâmetro (84 nm) e que predominam nos terminais nervosos em repouso (Brochier *et al.*, 1991), são denominadas vesículas 1 (VP1) ou vesículas de reserva. Estas são consideradas especializações evolutivas do terminal da electroplaca, possuindo 3 vezes mais ACh do que as vesículas da população de vesículas 2 (VP2), que é uma sub-população de vesículas de tamanho intermédio (Brochier *et al.*, 1991). Enquanto a população das vesículas VP2 pode ser denominada por vesículas recicladas ou prontas a serem libertadas, as vesículas VP1 são especializadas na geração de descargas eléctricas paralisantes (Van der Kloot, 2003).

Quando o nervo electromotor do *Torpedo* é estimulado, as vesículas VP2 são libertadas em primeiro lugar devido à sua localização, mesmo considerando que estas constituem uma pequena fracção das vesículas disponíveis no terminal nervoso,. A estimulação nervosa leva à libertação excitotónica do conteúdo das vesículas VP2 na fenda sináptica. A membrana destas vesículas sinápticas é recuperada por endocitose (Zimmermann & Whittaker, 1977) através de duas vias distintas. Uma das vias, consiste na reciclagem de vesículas VP2; através da segunda via, a membrana vesicular será utilizada na formação de vesículas de reserva (VP1)(Van der Kloot, 2003).

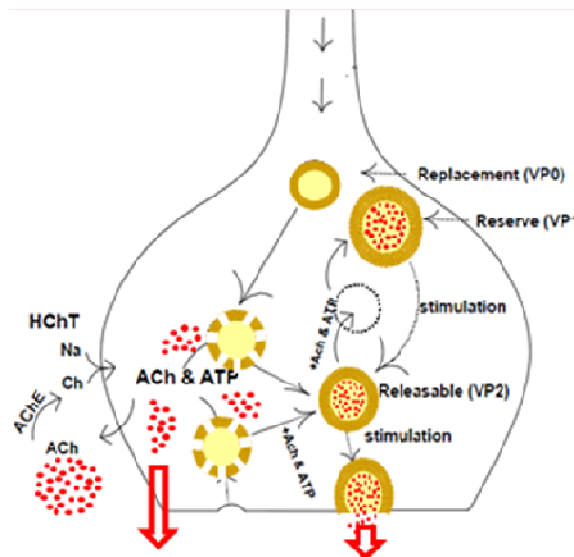


Figura 25: Os mecanismos de formação de vesículas sinápticas e a sua alteração no terminal nervoso do *Torpedo*. As vesículas desenhadas com uma linha sólida, estão seladas e são capazes de aumentar ou diminuir o seu conteúdo de ACh; as vesículas, desenhadas com uma linha ponteadas, são capazes de assimilar ACh (modificado por Whittaker (1987b) e adaptado de Van der Kloot, 2003).

Enquanto que as vesículas VP2 diminuem, o número de vesículas VP1 aumenta, indicando que as vesículas VP2 se transformam em vesículas VP1, aumentando o seu conteúdo em ACh, ATP e outros solutos. As vesículas VP1 recém-formadas são movidas para o compartimento de reserva. Quando o nervo é estimulado, as vesículas VP2 são libertadas por exocitose e as VP1 são mobilizadas a partir da reserva para o reservatório pronto a ser libertado (Zimmermann, 1979; Zimmermann & Denston, 1977; Van der Kloot, 2003).

A existência de grande disponibilidade de iões Ca^{2+} no meio extracelular (composição fisiológica do meio Krebs *Torpedo*, CaCl_2 3,4 mM) permite o estabelecimento de um gradiente iónico dos dois lados da membrana celular que é favorável à entrada de Ca^{2+} para o terminal nervoso, levando à rápida saturação dos mecanismos que regulam a libertação do neurotransmissor. Este fenómeno é conhecido por depressão tetânica e pode ser observado através da redução da amplitude do 2º EPP comparativamente ao 1º EPP quando o intervalo entre os dois estímulos é demasiado curto (por exemplo, 20 ms tal como se usou neste trabalho) para permitir a recuperação da actividade do terminal nervoso (ver figura 11).

Fenómeno semelhante foi observado na junção neuromuscular do músculo cutaneus pectoris da rã. Neste tecido a libertação de ACh diminui ao longo de um estímulo nervoso tetânico (de elevada frequência), que se pode explicar devido a alterações no tipo de vesículas recrutado e nas alterações subsequentes no número de quanta libertado (Wu & Betz, 1998). Diversos autores mostraram que as condições de estimulação nervosa influenciam o recrutamento de diferentes populações vesiculares. O recrutamento de vesículas VP1 fazem com que estas entrem no reservatório pronto a ser libertado. Comparativamente, a amplitude do potencial gerado para a libertação de vesículas VP2 recicladas é menor, devido à diminuição da concentração de ACh no axoplasma após a estimulação (Soria, 1983), embora esta diminuição também possa implicar uma diminuição da ACh libertada directamente a partir do reservatório citoplasmático mediada por mediatofores (Dunant *et al.*, 1972, 1977; Dunant & Israël, 2000).

Segundo Van der Kloot (2003) quando a taxa de estimulação é baixa, o material das membranas das vesículas é recuperado em grande parte pela via rápida – VP2. Quando a estimulação é intensa as vesículas de reserva (VP1) vão substituir as VP2, que foram libertadas. Assim, pode ser que quando a disponibilidade do Ca^{2+} no meio extracelular é elevada, a estimulação do terminal nervoso condicione uma diminuição

no conteúdo em ACh das vesículas prontas a serem libertadas após o 1º EPP ditada pela entrada maciça deste íon para o terminal. Uma segunda explicação para a depressão tetânica poderá estar relacionada com a saturação do microdomínio afecto aos sensores de cálcio pré-sinápticos que dificulta a observação de facilitação no 2º EPP. A diminuição da concentração extracelular de cálcio reduz o gradiente iónico dos dois lados da membrana celular atenuando a saturação dos mecanismos responsáveis pela libertação do neurotransmissor, facto que permite observar efeitos facilitatórios até então mascarados (Dunant *et al.*, 1980).

Segundo Zucker & Regehr (2002), a rápida sucessão de impulsos sinápticos de elevada frequência pode levar a um aumento transitório da libertação quântica de neurotransmissores. Este processo puramente pré-sináptico, denominado facilitação tetânica, contribui significativamente para a plasticidade da transmissão sináptica a curto prazo e é muito importante para as funções fisiológicas. Com a diminuição da concentração de Ca^{2+} extracelular, o mecanismo de facilitação é explicado pela acumulação de Ca^{2+} residual no terminal nervoso. Segundo esta teoria, os íões de Ca^{2+} que entram depois do primeiro estímulo poderão somar-se ao Ca^{2+} que entra após o segundo estímulo, levando ao aumento da concentração de Ca^{2+} intraterminal e, assim, ao aumento da probabilidade de libertação do neurotransmissor (Katz & Miledi, 1968). Posteriormente, foi demonstrado que o efeito do Ca^{2+} intraterminal era demasiado pequeno para promover a facilitação, surgindo uma nova teoria relacionada com a existência de locais com grande afinidade para o Ca^{2+} situados relativamente longe dos CCSV, mas que poderiam contribuir para o efeito facilitatório (Kamiya & Zucker, 1994).

Resumindo, é provável que as diferenças experimentais observadas neste trabalho quando se reduziu a concentração extracelular de Ca^{2+} (de 3,4 para 0,85 mM) se relacionem com a maior ou menor capacidade dos terminais pré-sinápticos libertarem ACh. Em condições de elevada probabilidade de libertação (concentração fisiológica de Ca^{2+} , 3,4 mM), a capacidade de facilitação da transmissão sináptica é reduzida devido à existência de um limite máximo de libertação. Outra explicação possível é a saturação do mecanismo secretor com a entrada maciça de Ca^{2+} em resposta ao estímulo-teste (Dunant *et al.*, 1980; Mukhamedyarov *et al.*, 2009). A diminuição da concentração extracelular de Ca^{2+} causou o aumento do efeito facilitatório do DMPP sobre a amplitude e a área dos potenciais de electroplaca (figuras 14 e 15), demonstrando uma

relação inversa entre os níveis extracelulares de Ca^{2+} (margem de segurança) e a magnitude do efeito facilitatório do DMPP sobre o potencial composto.

Segundo Fedchyshyn & Wang (2007), os parâmetros de tempo de propagação e de transmissão do sinal dependem tanto da magnitude como do intervalo dos estímulos sinápticos. Estudos clássicos na JNM de rã indicaram que a latência é um parâmetro estável numa variedade de condições (Barret & Stevens, 1972; Parnas *et al.*, 1989). Entretanto, evidências recentes obtidas noutras sinapses, sugerem que o período de latência consegue adaptar-se a novas condições (Waldeck *et al.*, 2000; Vyshedskiy *et al.*, 2000). Estes estudos levantam a possibilidade dos parâmetros temporais da libertação de ACh, incluindo a latência, poderem sofrer alterações dependentes ou independentes de alterações na sinapse (e.g. acumulação de Ca^{2+} intraterminal, depleção do reservatório de vesículas sinápticas). Fedchyshyn & Wang (2007) demonstraram que a estimulação axonal de elevada frequência prolonga os vários componentes temporais subjacentes à libertação de vesículas sinápticas. Este prolongamento pode ser atenuado pela redução do influxo de Ca^{2+} e, conseqüente, redução do cálcio extracelular.

Como as condições que influenciam a depressão sináptica parecem também influenciar a taxa de progressão da latência e sua variação (por exemplo, diminuição do cálcio extracelular), estes podem compartilhar os mesmos mecanismos subjacentes. Interpretando dados semelhantes, Schneggenburger *et al.* (2002) concluíram que a actividade de elevada frequência esgota o reservatório de vesículas sinápticas que estão prontas a ser libertadas, associando os locais de libertação de diferentes reservatórios de vesículas às diferenças nos períodos de latência. Não existe heterogeneidade nas distâncias entre as vesículas sinápticas e os locais de libertação de neurotransmissores. O aumento do tempo necessário ao recrutamento e libertação das vesículas mais distantes podem introduzir não só prolongamentos no período de latência, mas também variabilidade e assincronia nos eventos de libertação de ACh, o que poderá levar ao aumento da razão área/pico observado neste trabalho após a activação dos receptores nicotínicos pré-sinápticos pelo DMPP. No entanto, não se pode excluir a possibilidade do prolongamento do período de latência resultar de um período refractário dependente da actividade dos locais de libertação (Stevens & Wang, 1995) ou do esgotamento (ou dessensibilização) da maquinaria de libertação (sensores de Ca^{2+} , por exemplo) (Israël *et al.*, 1987; Hsu *et al.*, 1996; Fedchyshyn & Wang, 2007), levando, a curto prazo, a prolongamentos temporais transitórios.

Concluindo, os dados electrofisiológicos obtidos neste trabalho demonstram que a activação de receptores nicotínicos pré-sinápticos representam uma forma simples de modulação fisiológica por retrocontrolo positivo pela ACh libertada, tal como já tinha sido provado na junção neuromuscular de rato (Faria *et al.*, 2003; Timóteo *et al.*, 2003). Estes resultados são tanto mais relevantes quanto se demonstrou que a facilitação tetânica observada endogenamente pela redução dos níveis extracelulares do Ca^{2+} foi prontamente prevenida pela incubação com antagonistas dos receptores nicotínicos, DH- β -E (3 μ M) e hexametónio (HE, 1 mM). Estes resultados, obtidos na ausência de inibidores de AChE, sugerem a proximidade dos nAChR pré-sinápticos aos terminais pós-sinápticos, já que os nAChR conseguem ser activados antes da hidrólise da ACh pela AChE (Wonnacott, 1997).

Na 2ª parte deste trabalho, realizaram-se experiências no sentido de confirmar que o efeito facilitatório do DMPP se devia a uma acção predominantemente pré-sináptica, tal como era sugerido pela interpretação dos resultados electrofisiológicos. Se esta hipótese fosse correcta, o bloqueio da geração dos impulsos nervosos nos prismas usando TTX (um inibidor dos canais de sódio sensíveis à voltagem) deveria prevenir o efeito facilitatório do DMPP (100 μ M). Nas mesmas circunstâncias, a aplicação exógena de ACh (100 μ M) conjuntamente com o inibidor da AChE, neostigmina, deveria desencadear a despolarização pós-sináptica dos electróitos, independentemente da estimulação eléctrica dos prismas. Os resultados experimentais corroboraram a interpretação de que a activação de receptores nicotínicos pré-sinápticos são os responsáveis pelo efeito facilitatório do DMPP sobre os potenciais de electroplaca no órgão eléctrico de *T. marmorata*, ao contrário do que foi observado após a aplicação exógena de ACh.

Estes resultados foram confirmados avaliando directamente a libertação de ACh a partir de terminais nervosos (sinaptossomas) isolados a partir do órgão eléctrico de *Torpedo* despolarizados com VT ou KCl. Nestas condições experimentais, o DMPP facilitou a libertação de ACh secundária à despolarização dos sinaptossomas, confirmando a natureza pré-sináptica do seu efeito. Tal como foi observado na junção neuromuscular de rato (ver Faria *et al.*, 2003), o efeito facilitatório do DMPP sobre a libertação de ACh foi prevenido pelo antagonista nicotínico, DH- β -E, indicando a presença de receptores nicotínicos contendo sub-unidades $\alpha 3/4\beta 2$ sensíveis àquele antagonista. Parece, pois, possível a existência de homologia funcional e estrutural entre os autoreceptores nicotínicos responsáveis pela facilitação da libertação de ACh na

junção neuromuscular do rato e na junção neuro-eléctrica do *Torpedo*. Este facto é surpreendente atendendo à falta de conservação estrutural das sinapses entre as duas preparações, tal como foi constatado nas imagens de microscopia confocal de fluorescência (figura 10). É, ainda, de realçar que o receptor nicotínico pós-sináptico existente nos electrócitos apresenta homologia estrutural com os receptores existentes no músculo esquelético, contendo sub-unidades $\alpha 1$ sensíveis à BTX (4 μM , $n=4$, resultados não apresentados). Tal como foi observado na junção neuromuscular de rato, este trabalho demonstrou que os receptores pós-sinápticos do *Torpedo* também são insensíveis ao DMPP.

Os nAChR pré-sinápticos têm uma maior permeabilidade ao Ca^{2+} comparativamente com as sub-unidades presentes nos terminais pós-sinápticos (Vernino *et al.*, 1994). Os dados experimentais obtidos neste trabalho permitem concluir que a entrada de Ca^{2+} que acompanha a activação do receptor pelo DMPP não foi suficiente para desencadear por si só a exocitose do neurotransmissor. No entanto, o influxo transitório de Ca^{2+} através do canal nicotínico pode ligar o nAChR a vias de segundos mensageiros intracelulares (por exemplo, a proteína cinase C), que podem elas próprias facilitar a exocitose devido ao aumento rápido do tamanho do reservatório de vesículas sinápticas prontas a serem libertadas (Singh & Prior, 1998). Para além disso, a despolarização dos terminais nervosos devido ao influxo de Na^+ através dos nAChR pode aumentar a concentração intracelular de Ca^{2+} desencadeada pelo influxo através de CCSV (Kulak *et al.*, 2001).

A concentração intracelular de cálcio, bem como a sua distribuição no interior do terminal nervoso, possuem um papel importante nos mecanismos que regulam a libertação do neurotransmissor. A libertação do transmissor é iniciada por concentrações muito elevadas de Ca^{2+} dentro de determinados microdomínios localizados próximo das zonas activas. No órgão eléctrico de *Torpedo*, são necessárias elevadas concentrações de Ca^{2+} para activar o mecanismo secretor (Israel *et al.* 1987; Dunant & Bloc, 2003; Dunant *et al.*, 2009). A elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} persiste por períodos muito curtos (após o potencial de acção) e ocorrem na proximidade do orifício interno do canal de Ca^{2+} quando este se abre (Yazejian *et al.*, 2000; Roberts, 1994). A libertação de ACh através do acoplamento das vesículas sinápticas e a sua ligação aos CCSV é essencial para o processo neurosecretor sensível a concentrações transitórias de Ca^{2+} durante a ocorrência do potencial de acção (Neher & Sakaba, 2008). O potencial de acção provoca uma breve “explosão” da libertação do

neurotransmissor, a chamada libertação síncrona, que pode ser explicada pela sua curta duração focada em micro- ou nanodomínios de elevada concentração de Ca^{2+} intraterminal responsáveis pela activação massiva e breve do mecanismo secretor. Assim, durante o potencial de acção, os CCSV abrem-se e fecham, havendo uma acumulação de Ca^{2+} seguida de um decaimento muito rápido em torno destes canais (Llinás *et al.*, 1981; Adler *et al.*, 1991; Stanley, 1993; Roberts, 1994; Yazejian *et al.*, 2000). Estudos recentes demonstraram que a libertação de neurotransmissores é desencadeada por uma subida transitória muito localizada da concentração de Ca^{2+} , que varia entre os 10 μM e os 100-200 μM ou mais em diferentes preparações (Llinás *et al.*, 1992 e 1995). O nanodomínio refere-se aos transientes de Ca^{2+} que estão muito próximos dos CCSV (10-100 nm). E o microdomínio inclui os nanodomínios, assim como regiões mais afastadas (200 nm a 1 μm de diâmetro) onde as concentrações de Ca^{2+} são mais baixas (Naraghi & Neher, 1997).

Outro factor que pode influenciar a libertação de ACh é a afinidade dos sensores de libertação fásica de Ca^{2+} , estando relacionados com a distância aos canais de Ca^{2+} . Os sensores de baixa afinidade estão situados mais perto (<100 nm) dos canais de Ca^{2+} (axónio da lula gigante, células bipolares do peixe dourado e órgão eléctrico do *Torpedo*, por exemplo), enquanto os sensores de elevada afinidade (sinapse em cálice, por exemplo) poderão estar em domínios celulares mais afastados, onde uma menor concentração de Ca^{2+} ainda activa estes sensores (Neher, 1998).

Estes processos operam em diferentes regimes cinéticos, uma vez que a cinética dos nanodomínios é dominada por elevações extremamente rápidas das concentrações de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) no terminal seguidas de uma redução igualmente rápida após o fecho dos CCSV. Nesses domínios, agentes quelantes rápidos como o BAPTA-AM conseguem uma rápida inactivação do Ca^{2+} após a sua ligação, enquanto os quelantes mais lentos como o EGTA-AM são ineficazes porque a difusão daquele ião ocorre numa escala muito diminuta de tempo (μs), que possui uma ou duas ordens de magnitude mais rápida que a difusão de longo alcance e a sequestração de Ca^{2+} (Naraghi & Neher, 1997).

Para avaliar a posição relativa dos locais de libertação de ACh face a uma possível entrada de Ca^{2+} no terminal nervoso por intermédio do receptor nicotínico, testou-se o efeito facilitatório do DMPP na ausência e na presença de dois quelantes de Ca^{2+} com cinéticas de ligação ao ião distintas: o BAPTA-AM é ~160-400 vezes mais rápido que o EGTA-AM na realização dessa tarefa (Tsien, 1980; Naraghi, 1997). Na

presença do quelante de Ca^{2+} com cinética lenta observou-se um aumento da amplitude do EPP. Este efeito, poderá dever-se à sequestração do Ca^{2+} residual intraterminal (Fedchyshyn & Wang, 2007) que estaria, hipoteticamente, a inibir (parcialmente) os CCSV (Catterall, 2000) ou os sensores de Ca^{2+} (Israël *et al.*, 1987), resultando numa menor libertação de ACh. Este efeito não parece estar relacionado com a relação espacial entre os nAChR e os CCSV. Já a diminuição ligeira da libertação de ACh observada em função do tempo de incubação com o quelante rápido, BAPTA-AM, evidencia um elevado grau de acoplamento entre os CCSV e os sensores de Ca^{2+} envolvidos na neurosecreção. Ambos os quelantes, BAPTA-AM e EGTA-AM, preveniram eficazmente a detecção do efeito facilitatório do DMPP sobre a libertação de ACh. Os dados mostram que os dois agentes quelantes foram equipotentes na prevenção do efeito do DMPP. Estes resultados preliminares sugerem a inexistência de co-localização entre os sensores de Ca^{2+} responsáveis pela libertação de ACh e os nAChR activados, salientando que a sua relação espacial dista pelo menos 100-200 nm (Mukhamedyarov *et al.*, 2009). Para confirmar esta hipótese serão necessários mais estudos fazendo variar a concentração dos agentes quelantes de forma fina ou realizar as experiências onde se reduza a margem de segurança da transmissão, tal como foi mostrado nalgumas experiências contidas neste trabalho.

VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho, mostrou-se pela primeira vez o envolvimento de receptores nicotínicos pré-sinápticos na modulação da transmissão colinérgica rápida no órgão eléctrico de *T. marmorata*. Foi possível demonstrar que a ACh facilita a sua própria libertação através da activação de autoreceptores nicotínicos contendo sub-unidades $\alpha 3/4\beta 2$. No entanto, mais estudos são necessários para caracterizar com certeza o subtipo dos receptores nicotínicos envolvidos usando antagonistas selectivos, como por exemplo, a metilcaconitina (MLA) que antagoniza competitivamente as sub-unidades $\alpha 7$ dos nAChR; a conotoxina MII (CTX MII) que possui um elevado grau de selectividade para as sub-unidades $\alpha 3\beta 2$ (Cartier *et al.*, 1996) podendo também afectar nAChR com sub-unidades $\alpha 6$ de elevada afinidade (Kuryatov *et al.*, 2000).

Também foi possível demonstrar que a elevação transitória do Ca^{2+} no interior do terminal nervoso influencia a activação dos receptores nicotínicos pré-sinápticos. Relativamente à determinação da sua relação espacial com os locais de libertação de ACh, concluímos que os sensores de Ca^{2+} responsáveis pela libertação de ACh e os nAChR activados pelo DMPP não estão co-localizados, embora sejam necessários mais estudos para podermos afirmar essa relação. Para tal, dever-se-à variar a concentração dos agentes quelantes de Ca^{2+} , realizar experiências em condições de redução da margem de segurança da transmissão sináptica (baixar a concentração de Ca^{2+} extracelular), assim como medir directamente a quantidade de neurotransmissor libertado por métodos radioisotópicos.

O *Torpedo* utiliza frequências de disparo elevadas durante períodos de tempo muito curtos. A sua elevada eficiência do processo de libertação inicial é responsável pela produção de descargas de cinco a dez impulsos com frequências de aproximadamente 100 Hz (Dunant *et al.*, 1980). Tendo conhecimento destas características fisiológicas e comportamentais é necessário realizar estudos com estimulação repetitiva, para avaliar melhor a presença ou ausência de depressão tetânica intrínseca, assim como perceber qual a verdadeira repercussão da autofacilitação nicotínica e do papel do Ca^{2+} da fisiologia do animal.

O estudo deste modelo de transmissão colinérgica rápida evidenciando grande homologia funcional com a junção neuromuscular noutras espécies e cuja facilidade de manipulação ficou patente neste trabalho, poderá ser aplicado no estudo de doenças neuromusculares, como a miastenia gravis no Homem.

Referências bibliográficas

- Abdel-Aziz, S.H. (1994). Observations on the biology of the common *Torpedo* (*Torpedo torpedo*, Linnaeus, 1758) and marbled electric ray (*Torpedo marmorata*, Risso, 1810) from Egyptian Mediterranean waters. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. 45(4), 693-704.
- Adler, E.M.; Augustine, G.J.; Duffy, S.N. & Charlton, M.P. (1991). Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *The Journal of Neuroscience*. 11, 1496–1507.
- Augustine, G.J.; Adler, E.M. & Charlton, M.P. (1991). The calcium signal for transmitter secretion from presynaptic nerve terminals. *Annals of the New York Accademy of Sciences*. 635, 365–381.
- Barrett, E.F. & Stevens, C.F. (1972). The kinetics of transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology*. 227, 691–708.
- Belbenoit, P. (1986). Fine analysis of predatory and defensive motor events in *Torpedo Marmorata*. *Journal of experimental Biology*. 121, 197-226.
- Bennett, M. V. L.; Wurzel, M. & Grundfest, H. (1961). The Electrophysiology of Electric Organs of Marine Electric Fishes. *The Journal of General Physiology*. 44, 757-804.
- Bowman, W.C.; Marshall, I.G.; Gibb, A.J. & Harborne, A.J. (1988). Feedback control of transmitter release at the neuromuscular junction. *Trends in Pharmacological Sciences*. 9, 16–20.
- Bowman, W.C.; Prior, C. & Marshall, I.G. (1990). Presynaptic receptors in the neuromuscular junction. *Annals of the New York Accademy of Sciences*. 604, 69–81.
- Brochier, G.; Israël, M. & Lesbats, B. (1991). Comparison of synaptic vesicles in neuromuscular and nerve–electroplaque junctions from *Torpedo marmorata*. *Comptes Rendus Hebdomadaires Séances de l' Academie des Sciences* (Paris). 313, 573-578.
- Capapé, C. & Desoutter, M. (1990) Torpedinidae. p. 55-58. In Quero, J.C.; Hureau, J.C.; Karrer, C.; Post, A.; Saldanha, L. (eds.) Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 1.
- Cartier, G.E.; Yoshikami, D.; Gray, W.R.; Luo, S.; Olivera, B.M. & McIntosh, J.M. (1996). A new α -conotoxin which targets $\alpha 3\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 271, 7522– 7528.
- Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 16, 521-555.
- Chavez-Noriega, L.E.; Crona, J.H.; Washburn, M.S.; Urrutia, A.; Elliott K.J. & Johnson E. C. (1997). Pharmacological characterization of recombinant human neuronal acetylcholine receptors $\text{h}\alpha 2\beta 2$, $\text{h}\alpha 2\beta 4_2$, $\text{h}\alpha 3\beta 2$, $\text{h}\alpha 3\beta 4$, $\text{h}\alpha 4\beta 2$, $\text{h}\alpha 4\beta 4$, and $\text{h}\alpha 7$ expressed

in *Xenopus* oocytes. *Journal of Pharmacologie and Experimental Therapeutics*. 280, 346–356.

Cohen-Cory, S. (2002). The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science*. 298, 770–776.

Correia-de-Sá, P.; Timóteo, M.A. & Ribeiro, J.A. (1996). Presynaptic A₁ inhibitory/A_{2A} facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *Journal of Neurophysiology*. 76, 3910–3919.

Datyner, N. B. & Gage, P. W. (1982). Secretion of acetylcholine in response to graded depolarization of motor nerve terminals. *Journal de physiologie*. 78, 412-416.

Davies, L. P.; Whittaker, V. P. & Zimmermann, H. (1977). Axonal Transport in the Electromotor Nerves of *Torpedo Marmorata*. *Experimental Brain Research*. 30, 493-510.

Dunant, Y.; Gaston, J.; Israël, M.; Lesbats, B. & Manaranche, R. (1972). Les compartiments d'acetylcholine de l'organe électrique de la Torpille et leurs modifications par la stimulation. *Journal of Neurochemistry*. 19, 1987-2002.

Dunant, Y.; Israël, M.; Lesbats, B. & Manaranche, R. (1977). Oscillation of acetylcholine during nerve activity in the *Torpedo* electric organ. *Brain Research*. 125, 123-140.

Dunant, Y.; Eder, L. & Servetiadis-Hirt, L. (1980). Acetylcholine release evoked by single or a few nerve impulses in the electric organ of *Torpedo*. *Journal of Physiology*. 298, 185-203.

Dunant, Y. & Muller, D. (1986). Quantal Release of Acetylcholine evoked by Focal Depolarization at the *Torpedo* nerve-electroplaque junction. *Journal of Physiology* (London). 379, 461-478.

Dunant, Y. & Israël, M. (2000). Neurotransmitter release at rapid synapses. *Biochimie*. 82 (4): 289-302.

Dunant, Y. & Bloc, A. (2003). Low- and High-Affinity Reactions in Rapid Neurotransmission. *Neurochemical Research*. 28 (3-4), 659-665.

Dunant, Y.; Cordeiro, J.M. & Gonçalves, P.P. (2009). Exocytosis, Mediatophore, and Vesicular Ca²⁺/H⁺ Antiport in Rapid Neurotransmission. *Mechanisms of Exocytosis: Annals of the New York Accademy of Sciences*. 1152, 100-112.

Edry-Schiller, J.; Ginsburg, S. & Rachamimoff, R. (1991). *Journal of Physiology* (London). 439, 627-647 in Shafir, I.; Feng, W. & Shoshan-Barmataz, V. (1998). Voltage-Dependent Anion Channel Proteins in Synaptosomes of the *Torpedo* Electric Organ: Immunolocalization, Purification, and Characterization. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 30 (5), 499-510.

Eldelyi, L. & Krenz, W.D. (1984). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 505-511 in Walz, D.; Berg, H. & Milazzo, G. (1995). Bioelectrochemistry of cells and tissue. *Birkhäuser Verlag Eds* (Basel, Boston & Berlin). Vol. 2, 301 pp.

- Fagerlund, M. J. & Eriksson, L. I. (2009). Current concepts in neuromuscular transmission. *British Journal of Anaesthesia*. 103 (1), 108–114.
- Faria, M.; Oliveira, L.; Timóteo, M.A.; Lobo, M.G. & Correia-de-Sá, P. (2003). Blockade of Neuronal Facilitatory Nicotinic Receptors Containing $\alpha 3\beta 2$ Subunits Contribute to Tetanic Fade in the Rat Isolated Diaphragm. *Synapse*. 49, 77–88.
- Fedchyshyn, M. J. & Wang, L. (2007). Activity-dependent changes in temporal components of neurotransmission at the juvenile mouse calyx of Held synapse. *Physiology*. 581(2), 581–602.
- Feldberg, W. & Fessard, A. (1942). The cholinergic nature of the nerves to the electric organ of the *Torpedo* (*Torpedo Marmorata*). *Journal of Physiology*. 101, 200-216.
- Fessard, A. (1958). Les organes électriques, in *Traité de Zoologie*. Grassé P.P. ed. Masson, Paris. 1143-1238.
- Fucile, S. (2004). Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*. 35:1–8.
- Gibb, A.J. & Marshall, I.G. (1986). Nicotinic antagonists produce different amounts of tetanic fade in the isolated diaphragm of the rat. *British Journal of Pharmacology*. 89, 619–624.
- Gonçalves, E. & Beldade, R. Ó (2000). Avaliação do estado de conhecimento e monitorização das comunidades ictiológicas da Ria Formosa no âmbito da monitorização dos impactes das dragagens nas ilhas barreira e nas comunidades ictiológicas e bentónicas. Estudo realizado no âmbito da empreitada de requalificação do Sistema Lagunar da Ria Formosa. Relatório Final (Dezembro 2000). Lisboa: Unidade de Investigação em Eco-Etologia/Instituto Superior de Psicologia Aplicada. 27pp.
- Göthel, H. (1992). Fauna marina del Mediterráneo. *Ediciones Omega S.A.*, Barcelona. 319 pp.
- Gotter, A. L.; Kaetzel, M. A. & Dedman, J. R. in Sperelakis, N. (2001). 60: Electrocytes of Electric Fish. Section VI: Muscle and other contractile systems. *Cell Physiology Sourcebook: A molecular approach*. 3rd Edition. 1025-1038.
- Gotti, C.; Zoli, M. & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*. 27 (9), 482–91.
- Grundfest, H. (1957). Electrical inexcitability of synapses and some consequences in the central nervous system. *Physiological Reviews*. 37(3): 337-361.
- Heidelberger, R. (2007). Neuroscience: sensors and synchronicity. *Nature*. 450, 623–625.
- Hogg, R. C; Ragganbass, M. & Bertrand, D. (2003). Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Reviews Physiology Biochemistry and Pharmacology*. 147, 1–46.

- Hsu, S.F.; Augustine, G.J. & Jackson, M.B. (1996). Adaptation of Ca^{2+} -triggered exocytosis in presynaptic terminals. *Neuron*. 17, 501–512.
- Israël, M.; Lesbats, N.; Morel, N.; Manaranche, R.; Gulik-Krzywicki, T. & Dedieu, J.C. (1984). Reconstitution of a function synaptosomal membrane possessing the protein constituents involved in acetylcholine translocation. *Proceedings of the National Academie of Sciences (USA)*. 81, 277-282.
- Israël, M.; Meunier, F. M.; Morel, N. & Lesbats, B. (1987) Calcium induced desensitization of acetylcholine release from synaptosoma or proteoliposomes equipped with mediatoaphore, a presynaptic membrane protein. *Journal of Neurochemistry*. 49, 975-982.
- Katz, B. & Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *Journal of Physiology*. 195, 481–492.
- Katz, B. (1969). The release of neural transmitter substances. in *The Sherrington Lectures*. vol. x. Liverpool: Liverpool University Press.
- Kamiya, H. & Zucker, R.S. (1994). Residual Ca^{2+} and short-term synaptic plasticity. *Nature*. 371, 603–606.
- Kubalek, E.; Ralston, S.; Lindstrom, J. & Unwin, N. (1987). Location of subunits within the acetylcholine receptor by electron image analysis of tubular crystal from *Torpedo marmorata*. *Journal of Cell Biology*. 105, 9-18.
- Kulak, J.M.; McIntosh, J.M.; Yoshikami, D. & Olivera, B. (2001). Nicotine evoked transmitter release from synaptosomes: functional association of specific presynaptic acetylcholine receptors and voltage-gated calcium channels. *Journal of Neurochemistry*. 77, 1581–1589.
- Kuryatov, A.; Olale, F.; Cooper, J.; Choi, C. & Lindstrom, J. (2000). Human α_6 AChR subtypes: subunit composition, assembly, and pharmacological responses. *Neuropharmacology*. 39, 2570–2590.
- Le Novere, N.; Corringer, P.J. & Changeux, J.P. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: Evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *Journal of Neurobiology*. 53, 447–456.
- Llinas, R.; Steinberg, I. Z. & Walton, K. (1981). Relationship between Presynaptic Calcium Current and Postsynaptic Potential in Squid Giant Synapse. *Biophysiology Journal*. 33, 323-351.
- Llinás, R.; Sugimori, M. & Silver R. (1992). Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science*. 256 (5057): 677-679.
- Llinas, R.; Sugimori, M. & Silver R.B. (1995) The concept of calcium concentration microdomains in synaptic transmission. *Neuropharmacology*. 34, 1443–1451.
- Lukas, R.J.; Changeux, J.P.; Le Novère, N.; Albuquerque, E.X.; Balfour, D.J.K.; Berg, D.K.; Bertrand, D.; Chiappinell, V.A.; Clarke, P.B.; Collins, A.C.; Dani, J.A.; Grady, S.R.; Kellar, K.J.; Lindstrom, J.M.; Marks, M.J.; Quick, M.; Taylor, P.W. & Wonnacott,

- S. (1999). International Union of Pharmacology: XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacological Research*. 51 (2), 397–401.
- Marchbanks, R. M. & Israël, M. (1971). Aspects of acetylcholine metabolism in the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Journal of Neurochemistry*. 18 (3): 439-448.
- Matzner, H.; Parnas, H. & Parnas, I. (1988). Presynaptic effects of d-tubocurarine on neurotransmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *Journal of Physiology* (London). 398, 109–121.
- Michael, S.W. (1993) Reef sharks and rays of the world. A guide to their identification, behavior, and ecology. *Sea Challengers*, Monterey, California. 107 pp.
- Mideli, R.; Molinoff, P. & Potter, L.T. (1971). *Nature*. London. 554-557 in Walz, D.; Berg, H.; Milazzo, G. (1995). Bioelectrochemistry of cells and tissue. *Birkhäuser Verlag Eds* (Basel, Boston & Berlin). Vol. 2, 301 pp.
- Millar, N.S. & Gotti, C. (2009) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*. 56, 237–246.
- Missias, A.C.; Chu, G.C.; Klocke, B.J.; Sanes, J.R. & Merlie, J.P. (1996). Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: regulation of the AChR gamma-to-epsilon switch. *Developmental Biology*. 179, 223–238.
- Møller, P.R. (1995) Electric fishes: history and behavior. *Chapman & Hall* (London). 584 p.
- Morel, N.; Israël, M.; Manaranche, R. & Mastiur-Frachon, P. (1977). Isolation of Pure Cholinergic Nerve Endings from *Torpedo* Electric Organ: Evaluation of Their Metabolic Properties. *The Journal of Cell Biology*. 75, 43-55.
- Morel, N.; Manaranche, R.; Israël, M. & Gulik-Krzywicki, T. (1982). Isolation of a Presynaptic Plasma Membrane Fraction from *Torpedo* Cholinergic Synaptosomes: Evidence for a Specific Protein. *The Journal of Cell Biology*. 93, 349-356.
- Mukhamedyarov, M.A.; Grishin, S. N.; Zefirov, A.L. & Palotás, A. (2009). The mechanisms of multi-component paired-pulse facilitation of neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction. *European Journal of Physiology*. 458, 563–570.
- Nachmansohn, D. & Lederer, E. (1939). *Bulletin de Societe Chimie Biologique* (Paris). 21, 797-808 in Walz, D.; Berg, H.; Milazzo, G. (1995). Bioelectrochemistry of cells and tissue. *Birkhäuser Verlag Eds* (Basel, Boston & Berlin). Vol. 2, 301 pp.
- Naraghi, M. (1997). T-jump study of calcium binding kinetics of calcium chelators. *Cell Calcium*. 22 (4): 255-268.
- Naraghi, M. & Neher, E. (1997). Linearized buffered Ca^{2+} diffusion in microdomains and its implications for calculation of $[\text{Ca}^{2+}]$ at the mouth of a calcium channel. *The Journal of Neuroscience*. 17, 6961–6973.

- Neher, E. (1998) Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*. 20, 389–399.
- Neher, E. & Sakaba, T. (2008) Multiple Roles of Calcium Ions in the Regulation of Neurotransmitter Release. *Neuron*. 59, 861-872.
- Parnas, H.; Hovav, G. & Parnas, I. (1989). Effect of Ca^{2+} diffusion on the time course of neurotransmitter release. *Biophysiology Journal*. 55, 859–874.
- Picton, B.E. & Morrow, C.C. (2009) [In] *Encyclopedia of Marine Life of Britain and Ireland* <http://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp?item=ZF1220>
- Rizzoli, S.O. & Betz, W.J. (2004). The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science*. 303, 2037–2039.
- Roberts, W. M. (1994). Localization of Calcium Signals by a Mobile Calcium Buffer in Frog Sacculus Hair Cells. *The Journal of Neuroscience*. 14 (5): 3246- 3262.
- Rochon, D.; Rousse, I. & Robitaille, R. (2001). Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience*. 21, 3819–3829.
- Sakmann, B.; Methfessel, C.; Mishina, M.; Takahashi, T.; Takai, T.; Kurasaki, M.; Fukuda, K. & Numa, S. (1985). Role of acetylcholine receptor subunits in gating of the channel. *Nature*. 318, 538-543.
- Schmid, D.; Stadler, H. & Whittaker, V.P. (1982). *European Journal of Biochemistry*. 122, 633-639 in Walz, D.; Berg, H. & Milazzo, G. (1995). Bioelectrochemistry of cells and tissue. *Birkhäuser Verlag Eds* (Basel, Boston & Berlin). Vol. 2, 301 pp.
- Schneggenburger, R.; Sakaba, T. & Neher, E. (2002). Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends in Neurosciences*. 25, 206–212.
- Sheridan, M. N. (1965). The fine structure of the electric organ of *Torpedo Marmorata*. *Journal of Cell Biology*. 24, 129-141.
- Singh, S. & Prior, C. (1998). Prejunctional effects of the nicotinic ACh receptor agonist dimethylphenylpiperazinium at the rat neuromuscular junction. *Journal of Physiology (London)*. 511, 451–460.
- Soria, B. (1983). Properties of miniature post-synaptic currents at the *Torpedo marmorata* nerve-electroplaque junction. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 68, 189-202.
- Stanley, E.F. (1993). Single calcium channels and acetylcholine release at a presynaptic nerve terminal. *Neuron*. 11, 1007–1011.
- Stehmann, M. & Bürkel, D.L. (1984) Torpedinidae. p. 159-162. In Whitehead, P.J.P.; Bauchot, M.-L.; Hureau, J.-C.; Nielsen, J. & Tortonese, E. (eds.) *Fishes of the north-eastern Atlantic and Mediterranean*. UNESCO, Paris. Vol. 1.

- Stevens, C.F. & Wang, Y. (1995). Facilitation and depression at single central synapses. *Neuron*. 14, 795–802.
- Timóteo, M.A.; Faria, M. & Correia-de-Sá, P. (2003). Endogenous adenosine prevents post-tetanic release facilitation mediated by $\alpha 3\beta 2$ nicotinic autoreceptors. *European Journal of Pharmacology*. 464, 115–125.
- Tsien, R. Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*. 19(11): 2396-2404.
- Valenzuela, C. F.; Dowding, A. J.; Arias, H. R. & Johnson, D. A. (1994). Antibody-induced conformational changes in the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor: a fluorescence study. *Biochemistry*. 33, 6586-6594.
- van der Land, J.; Costello, M.J.; Zavodnik, D.; Santos, R.S.; Porteiro, F.M.; Bailly, N.; Eschmeyer, W.N. & Froese, R. (2001). Pisces - Chondrichthyes, in: Costello, M.J. *et al.* (Ed.) (2001). European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. Collection Patrimoines Naturels. 50, 358-360.
- Van der Kloot, W. & Molgo, J. (1994). Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiology Reviews*. 74, 899–991.
- Van der Kloot, W. (2003). Loading and recycling of synaptic vesicles in the *Torpedo* electric organ and the vertebrate neuromuscular junction. *Progress in Neurobiology*. 71, 269-303.
- Vernino, S.; Rogers, M.; Radcliffe, K.A. & Dani, J.A. (1994). Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of Neuroscience*. 14, 5514–5524.
- Vyshedskiy, A.; Allana, T. & Lin, J.W. (2000). Analysis of presynaptic Ca^{2+} influx and transmitter release kinetics during facilitation at the inhibitor of the crayfish neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience*. 20, 6326–6332.
- Waldeck, R.F.; Pereda, A. & Faber, D.S. (2000). Properties and plasticity of paired-pulse depression at a central synapse. *The Journal of Neuroscience*. 20, 5312–5120.
- Walz, D.; Berg, H. & Milazzo, G. (1995). Bioelectrochemistry of cells and tissue. *Birkhäuser Verlag Eds* (Basel, Boston & Berlin). Vol. 2, 301 pp.
- Waud, B. E. & Waud, D. R. (1971). The relation between tetanic fade and receptor occlusion in the presence of competitive neuromuscular block. *Anesthesiology*. 35, 456-464.
- Wessler, I. (1989). Control of transmitter release from the motor nerve by presynaptic nicotinic and muscarinic autoreceptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 10, 110–114.

- Whittaker, V. P. (1986). *Trends in Pharmacological Sciences*. 7, 312-315 in Walz, D.; Berg, H. & Milazzo, G. (1995). Bioelectrochemistry of cells and tissue. *Birkhäuser Verlag Eds* (Basel, Boston & Berlin). Vol. 2, 301 pp.
- Whittaker, V. P. (1987). Cholinergic Function in the Nineties: Advantages of Work with a Model System. *Neurochemical Research*. 12 (2), 121-128.
- Whittaker, V. P. (1987b). Cholinergic synaptic vesicles from the electromotor nerve terminals of *Torpedo*: composition and life cycle. *Annals of the New York Accademy of Sciences*. 493, 77-91.
- Wonnacott, S. (1997). Presynaptic nicotinic Ach receptors. *Trends in Neurosciences*. 20, 92-98.
- Wood, S.J. & Slater, C.R. (2001). Safety factor at the neuromuscular junction. *Progress in Neurobiology*. 64, 393-429.
- Wu, L.-G. & Betz, W. J. (1998). Kinetics of synaptic depression and vesicle recycling after tetanic stimulation of frog motor nerve terminals. *Biophysiology. J.* 74, 3003-3009.
- Yazejian, B. M.; Sun, X.-P. & Grinnell, A. D. (2000). Tracking presynaptic Ca^{2+} dynamics during neurotransmitter release with Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Nature Neuroscience*. 3, 566-571.
- Zimmermann, H. (1979). Vesicle recycling and transmitter release. *Neuroscience*. 4, 1773-1804.
- Zimmermann, H. & Whittaker, V. P. (1977). Morphological and biochemical heterogeneity of cholinergic synaptic vesicles. *Nature (Lond.)*. 267, 633-635.
- Zimmermann, H. & Denston, C. R. (1977). Separation of vesicles of different functional states from the cholinergic synapses of the *Torpedo* electric organ. *Neuroscience*. 2, 715-730.
- Zucker, R.S. & Regehr, W.G. (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annual Reviews of Physiology*. 64, 355-405.

ANEXO I

Figura 1: Representação esquemática do sistema de estímulo-registo de prismas de Torpedo

