

ISOLAMENTO DE UMA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM SINAPTOSOMAS DE CÉREBRO DA ABELHA *APIS MELLIFERA* UTILIZANDO GRADIENTE DESCONTÍNUO DE PERCOLL E IDENTIFICAÇÃO DE MIOSINAS V E VI

ISOLATION OF AN ENRICHED FRACTION OF SYNAPTOSOMES FROM APIS MELLIFERA BRAIN USING A DISCONTINUOUS PERCOLL GRADIENT AND IDENTIFICATION OF MYOSINS V AND VI

Maria de Fátima Rodrigues da SILVA¹; Pablo Marco Veras PEIXOTO²; Ana Alice Diniz SANTOS³; Foued Salmen ESPINDOLA⁴

RESUMO: Os sinaptosomas são estruturas vesiculares obtidas do sistema nervoso e constituem excelentes modelos experimentais utilizados para pesquisas sobre transmissão sináptica. Este trabalho mostra a preparação de sinaptosomas de cérebro da abelha *A. mellifera* a partir de uma fração solúvel aplicada sobre gradiente descontínuo de Percoll. A separação resultou em quatro frações subcelulares. Os resultados de “Western blots” mostraram a distribuição específica da clatrina, miosinas V e VI na camada correspondente a 15% do gradiente descontínuo de Percoll-sacarose. A análise por meio de microscopia eletrônica revelou que esta fração também é enriquecida em sinaptosomas. Frações enriquecidas em vesículas sinápticas de cérebro de abelha e a sua relação com proteínas motoras são importantes ferramentas para investigar as bases moleculares do sistema nervoso da abelha em diferentes estágios de desenvolvimento e condições comportamentais.

UNITERMOS: Cérebro de abelha, Sinaptosomas, Vesículas sinápticas, Miosina V, Miosina VI, *Apis mellifera*.

INTRODUÇÃO

Os sinaptosomas são estruturas vesiculares obtidas a partir de membranas de terminais sinápticos, contendo os componentes necessários para a realização dos processos de exocitose e endocitose como vesículas sinápticas, componentes do citoesqueleto e mitocôndrias. Eles representam um importante modelo experimental para pesquisa sobre transmissão sináptica (NAGY; DELGADO-ESCUETA, 1984).

Um dos eventos importantes para os processos de endocitose e exocitose é o transporte de vesículas, realizado por uma variedade de proteínas motoras que se deslocam sobre filamentos de actina ou de microtúbulos. Dentre as proteínas motoras, encontram-se as miosinas, que utilizam a energia do ATP para deslocar sobre o citoesqueleto de actina. Atualmente a superfamília de

miosinas está composta por 18 classes distintas (BERG et al., 2001) e apresentam um domínio motor na região N-terminal contendo os sítios ligantes de actina e de hidrólise de ATP, um domínio pescoço contendo sítios ligantes de cadeias leves regulatórias e um domínio cauda na região C-terminal que associam as miosinas à suas cargas. Dentre as diversas classes, as miosinas V e VI se destacam por transportar vesículas e organelas em uma variedade de tecidos de vertebrados e invertebrados (MERMALL et al., 1998; SELLERS, 2000; LANGFORD, 2002).

A miosina V foi identificada como uma proteína ligante de calmodulina presente em cérebro de coelho (LARSON et al., 1990; ESPINDOLA et al., 1992). Sua estrutura é formada por um dímero de cadeias pesadas de 190 kDa que apresenta em seu pescoço seis motivos IQ para calmodulina, o domínio C-terminal contendo

¹ Doutorado, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

² Mestrando Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

³ Professora, Doutora, Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Histologia, Universidade Federal de Uberlândia.

⁴ Professor, Doutor, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Uberlândia
Received 15/09/03 Accept 03/01/04

regiões em super-hélice intercaladas com três domínios globulares contém ainda uma cadeia leve que também é subunidade de dineína (ESPRAFICO et al., 1992; CHENEY et al., 1993; ESPINDOLA et al., 2000).

A miosina VI é um motor molecular amplamente distribuído em eucariontes superiores, sua estrutura molecular é composta por duas cadeias pesadas de 140 kDa e duas cadeias leve de calmodulina (KELLERMAN; MILLER, 1992; HASSON; MOOSEKER, 1994). Ela é um motor que se desloca em direção ao final menos dos filamentos de actina, em oposição à direção da maioria das outras miosinas (WELLS et al., 1999; NISHIKAWA et al., 2002; BIEMESDERFER, et al, 2002).

Um dos processos de endocitose de vesículas é por meio de vesículas revestidas de clatrina. Esta proteína participa do tráfego de membranas em todas as células eucariontes. Nesse processo a clatrina forma uma rede poliédrica que reveste a membrana a ser endocitada e facilita seu brotamento em forma de pequenas vesículas (PERSE, 1988; 2000; JIN; NOSSAL, 2000).

Estudos recentes indicam que a miosina VI associa-se a vesículas revestidas de clatrina por meio da sua região cauda. O sentido de deslocamento e colocalização em vesículas revestidas tornam a miosina VI um motor potencialmente envolvido em processos de endocitose de vesículas (BUSS et al., 2001a, 2001b; CROWTHER; PEARSE, 1981).

As abelhas *A. mellifera* são insetos que apresentam um comportamento social complexo, memória olfatória e capacidade de aprendizado. Estas habilidades associadas a um sistema nervoso simples as tornam um interessante modelo para estudos das bases moleculares de seu comportamento. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo a obtenção de sinaptosomas a partir de cérebro desse inseto. Para isso foi utilizado o método de fracionamento em gradiente Percoll-sacarose conforme descrito por Nagy e Delgado-Escueta (1984) e modificado por Dunkley et al. (1998). A preparação foi caracterizada por meio de microscopia eletrônica e pela detecção de proteínas relacionadas com o transporte de vesículas.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram coletadas abelhas operárias *A. mellifera* da colméia localizada na área de pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia.

As abelhas foram anestesiadas com éter etílico e os cérebros foram rapidamente dissecados e colocados em solução salina tamponada a 4° C.

A homogeneização seguiu o método de De Lima

et al. (1998) adaptado para os cérebros de abelha. Sessenta cérebros foram homogeneizados em tampão contendo glicose 10 mM, NaCl 200 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,8 mM, Hepes 25 mM tendo seu pH ajustado com TRIS para 7,4 e acrescido dos inibidores de proteases PMSF 0,5 mM, aprotinina 0,1 mM e benzamidina 1,0 mM. A homogeneização foi realizada em potter-Elvehjem a uma velocidade de 800 rpm, com intervalo de um minuto a cada cinco homogeneizações. Estes passos foram repetidos seis vezes. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 1000 xg por 10 minutos. A fração S1 resultante da centrifugação foi cuidadosamente colocada sobre o gradiente descontínuo de Percoll-sacarose para o fracionamento subcelular.

A obtenção de sinaptosomas baseou-se no método descrito por Nagy e Delgado-Escueta (1984) e adaptado por Dunkley et al. (1998). O gradiente foi preparado a partir de diluições do Percoll em solução contendo sacarose 0,32 mM, EDTA 1mM, DTT 25 mM, pH 7,4 ajustado com NaOH. O gradiente em tubo de policarbonato com capacidade para 15 mL consistiu em 2 mL de cada umas das seguintes concentrações de Percoll-sacarose: 23%, 15%, 10% e 3%. Aproximadamente 2,0 mL da fração S1 foram aplicadas sobre este gradiente, seguindo-se centrifugação na centrífuga da marca Hitachi, modelo Lumac CR 21 com rotor de ângulo fixo a 15.000xg, por 5 minutos. As frações foram coletadas com pipetas de ponta fina e lavadas duas vezes com o mesmo tampão em que os cérebros foram homogeneizados com centrifugação de 32.500xg por 15 minutos. Estas frações foram preparadas para análise por meio de microscopia eletrônica e “Western blots”.

As amostras foram aplicadas em gel de poliácridamida (5 a 16%) (SDS-PAGE) como descrito por Laemmly e Favre (1973). “Western blots” foram realizados segundo o método descrito por Towbin et al. (1979). Os polipeptídeos do gel foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose e em seguida, foram bloqueadas com leite desnatado. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos primários seguindo-se incubação com anticorpos secundários e reveladas com substratos apropriados. Os anticorpos utilizados foram: anti miosina VI preparado em coelho contra a cauda de miosina VI de porco; anticorpo policlonal contra cabeça miosina V de pintainho preparado em coelho; anti clatrina obtida da Transduction; anticorpos secundários anti IgG de coelho e anti IgG de camundongo da Boeringher. As dosagens de proteínas foram feitas pelo método de Bradford (1976).

Para análise morfológica por microscopia eletrônica, as frações coletadas do gradiente Percoll-

sacarose foram fixadas em solução de glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,3. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio reduzido (tetróxido de ósmio a 1% com ferrocianeto de potássio a 1,5%), infiltradas em resina de polimerização Epon e cortadas em ultramicrotomo *ReichertI*. Os cortes depositados em grades de cobre e submetidos à dupla contrastação com acetato de uranila a 3% (WATSON, 1958), citrato de chumbo a 1% (REYNOLDS 1963) e examinados no microscópio eletrônico de transmissão EM-109 da Zeiss.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fracionamento subcelular e análise bioquímica de sinaptosomas

Neste trabalho, foi utilizado o método de gradiente descontínuo de Percoll-sacarose para a separação de uma fração solúvel (S1) de cérebro de abelha resultando em quatro frações subcelulares. O Percoll é uma solução coloidal não tóxica utilizada com eficiência para a obtenção de sinaptosomas íntegros e funcionais tanto de vertebrados quanto de invertebrados (NAGY; DELGADO-ESCUETA, 1984; DUNKEY et al, 1994; NICHOLSON; CONNELLY, 1991). A figura 1A mostra os passos da preparação de S1 e a figura 1B mostra o tubo contendo o gradiente descontínuo e a distribuição das frações ao longo deste gradiente.

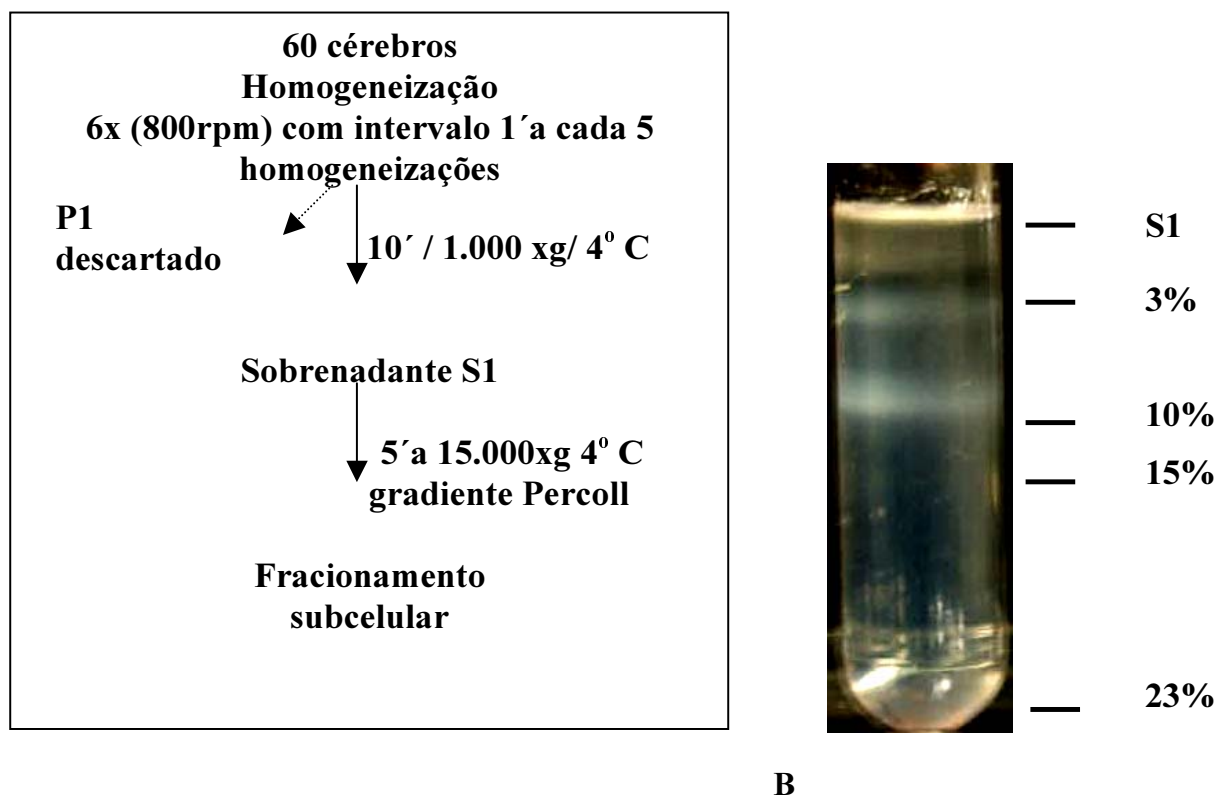


Figura 1. Esquema da preparação de sinaptosomas por centrifugação em Percoll-sacarose.

A - Esquema mostrando as etapas de obtenção de sinaptosomas. B - Fotografia das frações obtidas de S1 no fracionamento por gradiente Percoll-sacarose. S1- sobrenadante; P1- precipitado.

A análise por “Western blot” (figura 2), das frações subcelulares, mostrou que as proteínas motoras miosinas V e VI e a clatrina, uma proteína que atua na reciclagem de vesículas, localizaram-se na fração correspondente à banda de 15% do gradiente Percoll-sacarose. As proteínas motoras miosina V e miosina VI detectadas nesta preparação têm como uma de suas funções o transporte de vesículas. A miosina V é um motor molecular cujas propriedades bioquímicas são intensamente investigadas. Mani e colaboradores (1994) foram os primeiros a mostrar sua presença em sinaptosomas de rato associada a syntaxina, uma proteína de vesícula. Prekeris e Terrian (1997), mostraram que a miosina V associa-se a vesículas sinápticas via o complexo de proteínas sinaptofisina/ sinaptobrevina. A miosina V também se encontra associada a proteínas de vesículas VAMP/sinaptobrevina (OHYAMA et al., 2001) e proteína calmodulina quinase II (COSTA et al., 1999). Estudos bioquímicos de frações microssomais de cérebros de pintainho e rato mostraram que a miosina V está fortemente associada a vesículas sendo que esta associação é mantida sob diversas condições como a presença de alta concentração de sal, ATP ou detergente e só é rompida em condições drásticas como a presença

de tiocinato ou pH elevado (EVANS et al., 1998).

Ensaio de imunoprecipitação de miosina V a partir de sinaptosomas confirmaram que a miosina V associa-se a CaM quinase II e proteínas de vesícula como sinaptofisina e syntaxina. Foi demonstrado também que a miosina V é clivada por calpaína na presença de cálcio em sinaptosomas despolarizados sugerindo que esta proteína esteja envolvida em eventos sinápticos relacionados com a sinalização por cálcio (CASALETTI et al., 2003).

A participação da miosina VI na endocitose de vesículas é sugerida por duas características importantes, primeiro, ela é encontrada em associação com vesículas revestidas de clatrina (BUSS et al., 1998; BUSS et al., 2001a); segundo, a miosina VI desloca-se em direção contrária à das outras miosinas sobre filamentos de actina, o que possibilita o deslocamento de organelas em direção ao interior da célula devido o arranjo do citoesqueleto de actina na região cortical das células (WELLS et al., 1999). A detecção de miosina VI e clatrina na fração correspondente a 15% do gradiente sugere a presença de vesículas sinápticas ou membranas endocitadas no interior de sinaptosomas e evidencia que uma das funções da miosina VI possa ser a endocitose de membranas.

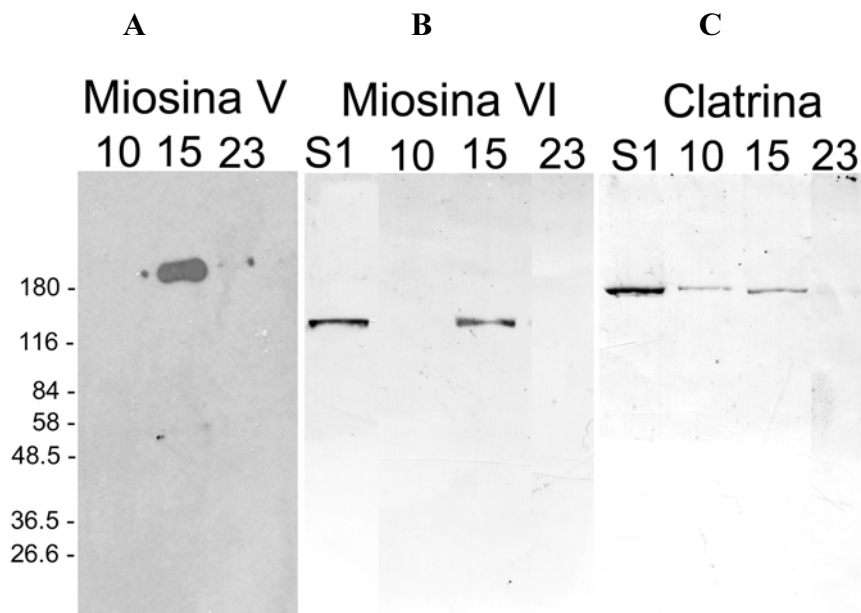


Figura 2. Identificação de miosinas VI, V e clatrina das frações do gradiente Percoll-sacarose.

“Western blot” das frações coletadas no gradiente Percoll-sacarose correspondentes às concentrações de 10, 15 e 23%. Foram aplicados 10 µg de proteína para cada etapa da preparação. A - Frações do gradiente sondados com anti cabeça de miosina V. Detecção por fosfatase alcalina; B - Frações do gradiente sondados com anti miosina VI. C - Frações do gradiente sondados com anti cadeia pesada de clatrina. À esquerda estão indicados os marcadores de peso molecular.

Análise ultraestrutural de sinaptosomas de abelha *A mellifera*

A microscopia eletrônica foi utilizada para analisar o conteúdo da fração contendo miosinas V e VI e clatrina obtida do gradiente Percoll-sacarose. As análises mostraram que esta fração é de fato enriquecida em sinaptosomas e que estes foram morfologicamente preservados (figuras 3 e 4). Os sinaptosomas apresentam estrutura arredondada com membranas bem definidas, enriquecidos em vesículas sinápticas com conteúdo

elétron-lúcido. Semelhante a sinaptosomas de gafanhoto a fração sinaptosomal de abelha também é composta por vesículas de fundo claro (BREER, 1983). Ainda, são observadas mitocôndrias intactas em seu interior. As características morfológicas concordam com os critérios descritos por Nagy e Delgado-Escueta (1984). Porém, foram observados restos celulares, junto à fração sinaptosomal sugerindo a necessidade de modificações no protocolo para se obter uma fração mais pura.

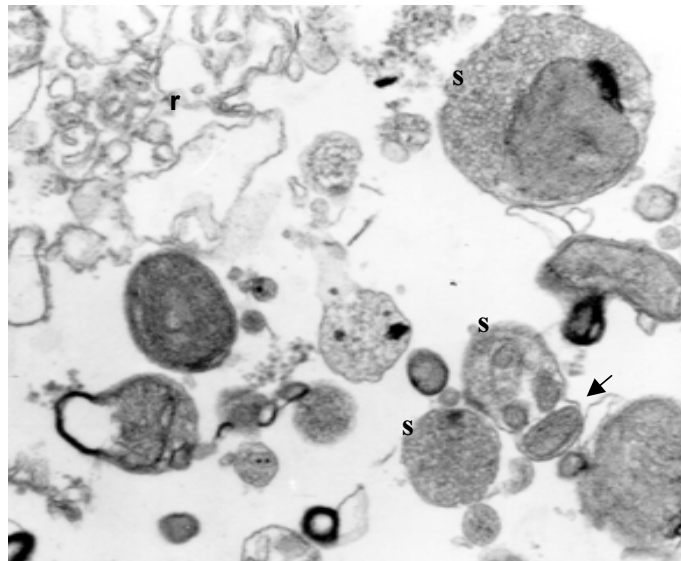


Figura 3. Eletromicrografia de sinaptosomas colhidos da fração correspondente a 15% do gradiente Percoll-sacarose. Observa-se a presença de vários sinaptosomas (s) contendo no seu interior inúmeras vesículas de fundo claro e mitocôndria (seta). 54.900X. r – restos celulares.

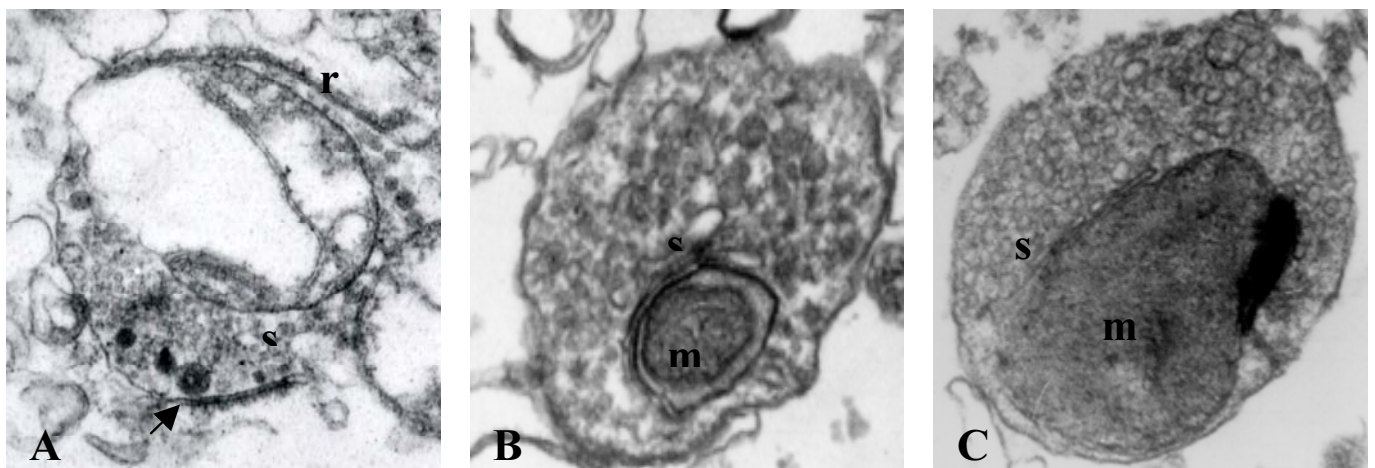


Figura 4. Eletromicrografias mostrando detalhe de sinaptosomas de abelha
A – Sinaptosoma (s) e densidade pós sináptica (setas) 30.700X; B e C – sinaptosomas (s) contendo inúmeras vesículas. Note que as vesículas, em sua maioria, exibem conteúdo elétron-lúcido. m - mitocôndria. 30.700X. 60.900X. r - restos celulares.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram o fracionamento sub celular do cérebro de *A mellifera* em gradiente de Percoll-sacarose. Análise por microscopia eletrônica revelou a presença de sinaptosomas na fração coletada na região correspondente a 15% do gradiente Percoll-sacarose. As proteínas motoras miosinas V e VI e clatrina, uma proteína de vesícula concentram-se na fração sinaptosomal do cérebro deste inseto. Este trabalho abre perspectivas para a utilização de sinaptosomas no entendimento da neuroquímica deste inseto em suas diversas fases de desenvolvimento e diferentes condições comportamentais.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do setor de histologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Às estudantes de iniciação científica Luciana Karen Calábria e Renata Roland Teixeira pela dissecação dos cérebros das abelhas.

À professora Dra Maria Elena De Lima e à doutoranda Flávia de Marco Almeida da Universidade Federal de Minas Gerais pela colaboração no preparo dos sinaptosomas.

À Dra Luciana Casalletti da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pela colaboração no preparo das amostras para microscopia eletrônica.

Ao técnico do laboratório de microscopia eletrônica Helgio Heinisch Werneck pelo auxílio na aquisição de imagens.

ABSTRACT: Synaptosomes have been used as model system for investigating presynaptic phenomena. In the present study, we describe the synaptosome preparation of *Apis mellifera* brain. A S1 brain fraction in Percoll gradient originated four subcellular fractions. “Western blots” data show that myosin V, myosina VI and clathrin are in the 3rd fraction. As demonstrated by electron microscopy, synaptosomes were found in this fraction. Based on the presence of myosin V and VI in the fractions containing synaptosomes, we suggest their association with synaptic vesicles. The attainment of synaptic vesicle enriched fractions from bee brain and the investigation of the motor proteins are important tools to investigate, in a molecular basis, the nervous system of bees in different development and behavioral conditions.

UNITERMS: Honeybee brain, Synaptosomes, Synaptic vesicle, Myosin V, Myosin VI, *Apis mellifera*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERG, J. S.; POWELL, B. C.; CHENEY, R. E. A millennial myosin census. **Mol. Biol. Cell.** v. 12, n. 4, p. 780-94, Ap.2001.

BIEMESDERFER, D.; MENTONE, S. A.; MOOSEKER, M. S.; HASSON, T. Expression of myosin VI within the early endocytic pathway in adult and developing proximal tubules. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v. 282, n. 5, p. F785- F794, May, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. **Anal Bioche.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BREER, H. Choline transport by synaptosomal membrane vesicle isolated from insect nervous tissue. **Febs Letter**, v.153, p.345-348, 1983.

BUSS, F.; ARDEN, S. D.; LINDSAY, M.; LUZIO, J. P.; KENDRICK-JONES, J. Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. **EMBO J**, v.20, p.3676-3684, Jul.2001a.

BUSS, F.; LUZIO, J. P.; KENDRICK-JONES, J. Myosin VI, a new force in clathrin mediated endocytosis. **Febs Lett.** v. 508, n. 23, p. 295-299, Nov. 2001b.

BUSS, F.; KENDRICK-JONES, J.; LIONNE, C.; KNIGHT, A. E.; COTE, G. P.; LUZIO, J. P. The localization of myosin VI at the Golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation. **J. Cell Biol.** v. 143, n. 6, p.1535-1545, Dez. 1998.

CASALETTI, L.; TAUHATA, S.B.F.; MOREIRA, J.E.; LARSON, R. Myosin-Va proteolysis by Ca²⁺/calpain in depolarized nerve endings from rat brain. **Biochem. Biophysical Res. Comm.** v. 308, n.1, p. 159-164, Aug. 2003.

CHENEY, R. E.; O'SHEA, M.K.; HEUSER, J. E.; COELHO, M.V.; WOLENSKI, J. S.; ESPREAFICO, E. M.; FORSCHER, P.; LARSON, R. E.; MOOSEKER, M. S.; Brain myosin V is two-headed unconventional myosin with motor activity. **Cell**, v. 5, n. 1, p.13-23, Oct.1993.

COSTA, M. C. R.; MANI, F.; SANTORO, W.; ESPREAFICO, E M.; LARSON, R. Brain myosin-V a calmodulin-carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase II and activates its kinase activity. **J. Biol. Chem.** v. 274, n. 22, p. 15311-15319, May, 1999.

CROWTHER, R. A.; PEARSE, B. M. Assembly and packing of clathrin into coats. **J Cell Biol.**, v. 91, n. 3, p. 790-797, Dec. 1981.

DE LIMA, M. E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; HUE, B.; LORET, E.; DINIZ, C. R.; ROCHA, T, H. On the binding of two scorpion toxins to the central nervous system of the cockroach *Periplaneta Americana*. **Insect Biochem**, v. 19, p. 413-422, 1989.

DUNKLEY, P. R.; HATH, J. W.; HARRISON, S. S.; JOARVIE, P. E.; GLENFIELD, P. J.; ROSTAS, A. P. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. **Brain Res.**, v. 441, p. 59-71, 1988.

ESPINDOLA, F. S.; ESPREAFICO, E. M.; COELHO, M. V.; MARTINS, A. R.; COSTA, F. R. C.; MOOSEKER, M. S.; LARSON, R. E. Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin. **J. Cell Biology**, v.118 n.2, p.359-368, Jul. 1992.

ESPINDOLA, F. S.; SUTER, D. M.; PARTATA, L. B.; CAO, T.; WOLENSKI, J. S, CHENEY, R. E.; SING, S. M.; MOOSEKER, M. S. The light chain composition of chicken brain myosin Va: calmodulin, myosin II essential light chains, and 8 kDa dynein light chain/PIN. **Cell Motil. Cytoskeleton**, v. 47, n. 4, p. 269-282, Dec. 2000.

ESPREAFICO, E. M.; CHENEY, R. E.; MATTEOLI, M.; NASCIMENTO, A. A, DE CAMILLI, P. V.; LARSON, R. E.; MOOSEKER, M. S. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. **J. Cell Biol.**, v.119, n. 6, p.1541-1557, Dec.1992.

EVANS, L. L.; LEE, A. J.; BRIDGMAN, P. C.; MOOSEKER, M. S. Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyses actin-based transport. **J. Cell Sci.**, v.111, p. 2055- 2066, Jul. 1998.

HASSON, T.; MOOSEKER, M. S. Porcine myosin-VI: characterization of a new mammalian unconventional myosin. **J. Cell Biol.**, v.127, n. 2, p.425- 440, Oct.1994.

JIN, A. G.; NOSSAL, R. Rigidity of triskelion arms and clathrin nets. **Biophys J**, v. 78, n. 3, p. 1183- 1194, Mar. 2000.

KELLERMAN, K. A.; MILLER, K. G. An unconventional myosin heavy chain gene from *Drosophila melanogaster*. **J. Cell Biol.**, v.119, n. 4, p.823-834, Nov. 1992.

LAEMMLI, U. K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. **J. Mol. Biol.**, v. 80, n. 4, p. 575-599, Nov.1973.

LANGFORD, G.M. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. **Traffic**, v.3, n.12, p.859-865, Dez. 2002.

LARSON, R. E.; ESPINDOLA, F. S.; ESPREAFICO, E. M.. Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. **J Neurochem.**, v. 54, n. 4, p.1288-1294, Apr.1990.

MANI, F.; ESPREAFICO, E.. M.; LARSON, R. E. Myosin- V is present in synaptosomes from rat cerebral cortex. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 11, p.2639- 2643, Nov. 1994.

MERMALL, V.; MCNALLY, J. G.; MILLER, K. G. Transport of cytoplasmic particles catalysed by an unconventional myosin in living *Drosophila* embryos. **Nature**. v.369, n. 6481, p. 560-562, Jun.1994.

MERMALL, V; POST, P.L.; MOOSEKER, M.S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. **Science.**, v. 279,p. 527-533, Jan. 1998

MILLER, K. E.; SHEETZ, M. P. Characterization of myosin V binding to brain vesicles. **J. Biol. Chem.**, v. 28, n. 4, p. 2598- 2606, Jan. 2000.

NAGY, A.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient. **J. Neurochem.**, v. 43, n. 4 p. 1114-1123, 1984.

NICHOLSON, R. A.; CONNELLY, M. Isolation of nerve endings from the central nervous system of the cricket (*Acheta domesticus*) using a Percoll gradient technique, **Insect Biochem**, v.21, p. 447-456, 1991.

NISHIKAWA, S.; HOMMAS, K.; KOMOR, I. Y.; IWAKI, M.; WAZAWA, T.; IWANE, A. H.; SAITO, J.; IKEBE, R.; KATAYAMA, E.; YANAGIDA, T.; IKEBE, M. Class VI myosin moves processively along actin filaments backward with large Steps. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 290, n. 1, p. 311-317, Jan, 2002.

OHYAMA, A.; KOMIYA, Y.; IGARASHI, M. Globular tail of myosin V is bound to vamp/synaptobrevin. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 280, n. 4, p. 988-991, Feb. 2001.

PERSE, B. M. Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits. **EMBO J.** v.7, p. 3331-3336. 1988.

PERSE, B. M. F.; SMITH, C. J.; OWEN, D. J. Clathrin coat construction in endocytosis. **Cur. Opin. Struct. Biol.**, v. 10, n. 2, p. 220-228, April, 2000.

PREKERIS, R.; TERRIAN, D. M. Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca²⁺ - dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. **J. Cell Biol.**, v. 137, n. 7, p. 1589-1601, Jun, 1997.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron- opaque stain in electron J. **Cell Biol.**, v. 17, p. 208-212, Apr, 1963.

SELLERS, J. R. Myosins: a diverse superfamily. **Biochim. Biophys. Acta- Mol. Cell. Res.** v. 1496, n. 1, p. 3-22, March, 2000.

TOWBIN, H. T.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.76, p. 4350- 4354, 1979.

WATSON, M. L. Staining of tissue section for electron microscopy with heavy metal. **J. Biophys. Biochem Cytol**, v. 4, p. 573, 1958.

WELLS, A. L.; LIN, A. W.; CHEN, L. Q.; SAFER, D.; CAINS, S. M.; HASSON, T.; CARRAGHER, B. O.; MILLIGAN, R. A.; SWEENEY, H. L. Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. **Nature**. v.401, n. 6752, p. 505–508. Sep.1999.