

La regulación del transportador

de colina de alta afinidad dependiente de AMPc/PKA no es mediada por dopamina en neuronas de retina

cAMP/PKA - dependent regulation of the high affinity choline transporter is not mediated by dopamine in retinal neurons

José L. Garay*[†]; William J. López H.*; Elis A. Mosquera F.*; José D. Subiela H.*; Nelson E. Loureiro D S.*^{††}

*Laboratorio de Fisiología Celular. Unidad de Investigaciones de Fisiología. Decanato de Ciencias de la Salud. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto-Venezuela.

[†]M.Sc ^{††}PhD

Correspondencia: Dr. José Garay, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado"

Decanato de Ciencias de la Salud. Laboratorio de Fisiología Celular. Unidad de Investigaciones de Fisiología. Av. Libertador junto al HCUAMP. CP: 3002. Barquisimeto-Venezuela.

Email: jgaray@ucla.edu.ve

Recibido: 09/07/2010

Aceptado: 15/09/2010

Resumen

La actividad del transportador de colina de alta afinidad (HACHT) es considerado el paso limitante en la síntesis de acetilcolina (ACh) en el terminal colinérgico. Estudios recientes muestran que el HACHT contiene residuos de serina y treonina consensuales para la fosforilación por proteína quinasa A (PKA). Usando neuronas de retina de embrión de pollo se evaluó el efecto del segundo mensajero AMPc sobre la actividad del HACHT. El aumento de los niveles intracelulares de AMPc a través de la inhibición de la fosfodiesterasa, activación de la adenilato ciclasa o usando un análogo de AMPc resistente a la fosfodiesterasa disminuyó la actividad del HACHT entre 29 y 69%. Por otra parte, la activación de receptores de dopamina tipo-D₁ aumenta los niveles de AMPc intracelular y activa PKA, sin embargo, el tratamiento con dopamina o con antagonistas de los receptores dopaminérgicos D₁ o D₂ no induce cambios en la actividad del transportador.

Palabras claves: Transportador de colina de alta afinidad, proteína quinasa A, dopamina.

Abstract

The high affinity choline transporter (HACHT) activity is considered to be the rate-limiting step in acetylcholine (ACh) synthesis in the cholinergic terminal. Recent studies show that HACHT contains consensus serine and threonine residues for protein kinase A (PKA) phosphorylation. Using chick retinal neurons evaluated the effects of the second messenger cAMP on the HACHT activity. The increase of the intracellular cAMP levels through phosphodiesterase inhibition, adenylatecyclase activation or using a phosphodiesterase-resistant cAMP analog decreased HACHT activity between 29 and 69%. Moreover, the activation of dopamine D₁-type receptors increase the intracellular cAMP levels and activates PKA, however, the treatment with dopamine D₁ or D₂ receptor antagonists does not induce changes on transporter activity.

Key words: High affinity choline transporter, protein kinase A, dopamine.

Introducción

El sistema colinérgico regula una gran variedad de mecanismos fisiológicos como memoria, aprendizaje, control motor, estados emocionales y el sueño. Sin embargo, también está involucrado en alteraciones del sistema nervioso central como

la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Las interacciones del sistema colinérgico con otros sistemas de neurotransmisores parecen estar relacionadas con estos eventos fisiológicos y fisiopatológicos, y su estudio

puede estar vinculado al descubrimiento de nuevos blancos farmacológicos y aplicaciones terapéuticas (Hans C. Fibiger, 1991; S. A. Talanov, 2005).

La síntesis de ACh depende directamente de la disponibilidad de colina (Yammamura y Snyder, 1978; Jope, 1979; Jope y Jenden, 1980; Blustajn y Wurtman, 1983). En las neuronas colinérgicas, la colina es captada por el HACHT, el cual está localizado en los terminales presinápticos. La captación de colina a través del HACHT es dependiente de los iones Na⁺ y Cl⁻, sensible a hemicolinio-3 (HC-3), y es considerada el paso limitante en la síntesis de ACh (Okuda T. y Haga T. 2000; Okuda T., et al. 2000; Okuda T. y Haga T. 2003; Ferguson S M., y Blakely R D. 2004).

El clonaje molecular del HACHT (Apparsundarams, et al. 2000, Apparsundarams, et al. 2001) permitió identificar la presencia de sitios consensuales para su fosforilación por PKA, sugiriendo la posibilidad que la fosforilación inducida por PKA esté involucrada en la regulación de la actividad del HACHT (Riveiro F M., et al., 2006). Recientemente, se ha demostrado que el HACHT es una fosfoproteína que sufre una rápida distribución entre el compartimiento endosómico y la membrana plasmática en respuesta a los cambios en la actividad de PKC y proteínas fosfatasa 1/2A (Gates J., et al. 2004). Otras evidencias confirman que el HACHT se localiza en diferentes grupos de vesículas y que su densidad en la membrana plasmática aumenta por estímulos que desencadenan la liberación de ACh (Ferguson SM., et al. 2003). Estos hallazgos han supuesto la consideración de un nuevo rol de las vesículas sinápticas en la homeostasis del neurotransmisor (Ferguson SM., et al. 2004).

En la actualidad no existen evidencias de la regulación de la dopamina sobre el terminal colinérgico, sin embargo, la dopamina es capaz de activar la adenilato ciclasa a través de los receptores dopaminérgicos tipo-D₁ y de inhibirla a través de los receptores tipo-D₂ en retina de embrión de pollo a partir del séptimo día del periodo embrionario (E7) (De Mello F G. 1978; DeMello Mc., et al. 1982; DeMello Mc y DeMello F G. 1985; Marques V A L y DeMello F G. 1990; Guimaraes M Z., et al. 2001).

En el presente trabajo, se utilizaron cultivos celulares de retina de embrión de pollo (tipo monocapa densa) como modelo biológico ya que bajo condiciones apropiadas pueden desarrollar muchas de las propiedades de retinas intactas incluyendo la presencia de diversos marcadores colinérgicos y dopaminérgicos de relevancia para este estudio (Baugman R y Bader C. 1977; Torrão A y Britto L. 2002). En estos cultivos celulares se procedió a cuantificar la actividad del HACHT en presencia de dopamina y otras sustancias (neurotransmisores o no) para evaluar la influencia de la vía de señalización AMPc/PKA sobre la actividad del transportador.

Materiales y métodos

Reactivos: [³H]-Colina (75 Ci/mmol) New England Nuclear, Boston, MA, USA. Dopamina, forskolina, IBMX (3-isobutil-1-metilxantina), pargilina, minimal essential medium (MEM), raclopride, (+)-SCH-23390 (R-(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-fenil-2,3,4,5-tetrahydro- H-3-benzazepina hidrocloreto), Sp-AMPC (Sp-adenosina 3', 5', hidrogenofosforotioato trietilamonio) y eserina; Sigma (St. Louis, MO, USA). Tripsina (Gibco, Paisley UK), suero fetal bovino (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), Hemicolinio-3 (HC-3) (ICN, Aurora, USA).

Cultivos celulares: Se disecaron retinas de embriones de pollo de 8 días (E8) (raza Isa Brown) bajo condiciones de esterilidad, siguiendo la metodología previamente descrita por De Mello, et al. 1990, y posteriormente sometidas a digestión enzimática con tripsina (0.05% en solución isotónica de Hanks libre de calcio y magnesio, 10 minutos, 37°C), seguidamente el tejido se centrifugó a 500g por 60 segundos, el sobrenadante se descartó y las células fueron resuspendidas en el medio de cultivo (10-15*10⁶ células por ml de medio). La disociación final se realizó mecánicamente pipeteando la suspensión diez veces. Las células se emplataron en cápsulas de Petri de 35 mm en medio de cultivo. Los cultivos celulares se mantuvieron en incubador a 37°C al 5% CO₂ y saturado de vapor de agua. El primer cambio de medio se llevó a cabo 24 horas después de la realización del cultivo, sucesivamente se procedió a sustituirlo cada 48 horas hasta el momento de su empleo en los experimentos.

Captación de [³H]-Colina: Las células se incubaron en MEM con 50 μM de eserina a 37°C, el volumen final fue en todos los casos de 1 ml y la concentración final de colina en el medio es de 7,16 μM. Independientemente del tratamiento dado a las células, se procedió a añadir 0.1 μCi de [³H]-Colina por 30 minutos en presencia y en ausencia de 50 μM de HC-3. Seguidamente se procedió a lavar las placas 5 veces con 2 ml de solución isotónica de Hanks libre de calcio y magnesio con 50 μM de eserina a pH y osmolaridad fisiológicos para eliminar cualquier excedente de radiactividad extracelular. Se cosecharon las células en agua pentadestilada induciendo la ruptura de las células mediante shock osmótico y se sometieron a tres ciclos de congelamiento/descongelamiento. Finalmente el lisado celular fue centrifugado y la radioactividad en el sobrenadante se determinó mediante un contador de líquido de centelleo. La captación específica de colina se calculó como el total de colina captada menos la colina captada en presencia de HC-3. Las proteínas en el pellet fueron determinadas usando el método de Lowry, et al. 1951, y los resultados se expresaron en pmol de colina captada por miligramo de proteína por minuto (pmol/mg/min).

Análisis de datos: Los resultados están expresados como la media ± error estándar, en algunos casos se presentan como porcentaje con respecto al control. Valores de 5 experimentos independientes fueron analizados mediante la prueba t

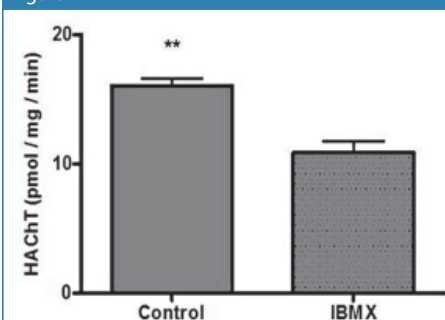
de student o ANOVA de una vía (utilizando la prueba de Bonferroni como test post hoc). La significancia estadística se estableció con un valor de $P < 0.05$.

Resultados

Efecto del aumento de AMPc intracelular sobre la actividad del HACHT: Con la finalidad de evaluar el efecto de la vía de señalización mediada por AMPc/PKA sobre la actividad del HACHT, se trataron los cultivos celulares con varios compuestos capaces de modularla. Primeramente los cultivos se trataron con $500 \mu\text{M}$ de IBMX por 10 minutos antes de medir la actividad del HACHT lo que produjo una reducción significativa de la captación de colina (Fig. 1), (aproximadamente 32%, $P < 0.0005$). Seguidamente se procedió a evaluar la actividad del HACHT en cultivos celulares tratados con $100 \mu\text{M}$ de Sp-AMPC (análogo de AMPc resistente a la acción de la fosfodiesterasa) por 45 minutos según lo descrito previamente por Gallo G., et al. 2002, evidenciándose una reducción de la captación de colina del 29% con respecto al control ($P < 0.005$) (Fig. 2). Finalmente los cultivos fueron tratados con $40 \mu\text{M}$ de forskolina (Lankford L., et al. 1988), y $500 \mu\text{M}$ de IBMX por 30 minutos obteniéndose un porcentaje de inhibición de 69% con respecto al control ($P < 0.0005$) y duplicando el efecto observado anteriormente con el IBMX $500 \mu\text{M}$ (Fig. 3). Estos resultados en conjunto sugieren entonces que el incremento de los niveles intracelulares de AMPc reduce la captación de colina mediada por el HACHT en cultivos celulares de retina de embrión de pollo, hallazgo nunca antes reportado en la literatura.

La dopamina no está involucrada en la regulación de la actividad del HACHT: Para determinar la influencia de la dopamina sobre la actividad del HACHT, dada su demostrada importancia como factor trófico, control del ciclo circadiano, supervivencia celular, adaptación a la luz y uno de los sistemas de neurotransmisión presentes en retina capaz de modificar los niveles intracelulares de AMPc (DeMello M.C. F., et al. 1982, Nowak JZ., et al. 1991; Nir I., et al. 2001; Doyle SE., et al. 2002; Witkosky P. 2004) los cultivos celulares fueron incubados con $100 \mu\text{M}$ de dopamina y $500 \mu\text{M}$ de IBMX por 60 minutos (Lankford K., et al. 1988; DeMello M.C. F., et al. 1982). Con la finalidad de descartar la posible degradación enzimática o la inactivación oxidativa de la dopamina, todos los experimentos se llevaron a cabo en presencia de $100 \mu\text{M}$ de pargilina y $100 \mu\text{M}$ de ácido ascórbico. La actividad del HACHT en los cultivos tratados con IBMX y dopamina se redujo significativamente con respecto al control (Fig. 4) (aproximadamente 34%, $P < 0.0001$).

Figura 1



Efecto de IBMX sobre la actividad del HACHT. Los cultivos celulares fueron incubados con $100 \mu\text{M}$ de IBMX evidenciándose una disminución significativa de la actividad del HACHT. La actividad del HACHT se expresa en pmol de colina/mg proteína/min. Los datos se presentan como la media \pm error estándar, valores de cinco experimentos evaluados por triplicado. (**): $P < 0.0005$.

Efecto del análogo de AMPc resistente a la acción de la fosfodiesterasa sobre la actividad del HACHT. Los cultivos celulares fueron incubados con $100 \mu\text{M}$ Sp-AMPC evidenciándose una disminución significativa de la actividad del HACHT. La actividad del HACHT se expresa en pmol de colina/mg proteína/min. Los datos se presentan como la media \pm error estándar, valores de cinco experimentos evaluados por triplicado. (*): $P < 0.005$.

Figura 2

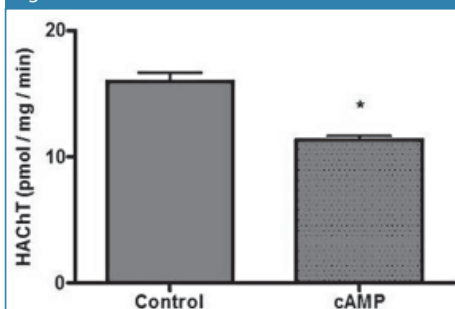
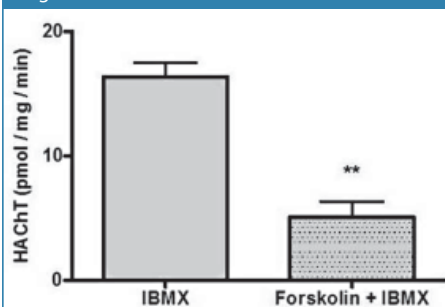


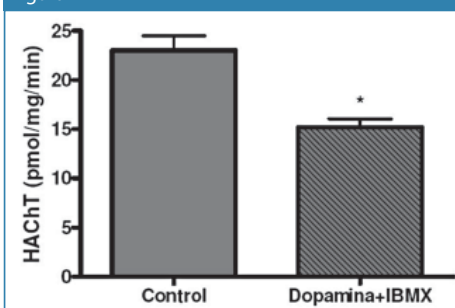
Figura 3



Efecto de IBMX y forskolina sobre la actividad del HACHT. Los cultivos celulares fueron incubados con $40 \mu\text{M}$ de forskolina y $500 \mu\text{M}$ de IBMX evidenciándose una disminución significativa de la actividad del HACHT. La actividad del HACHT se expresa en pmol de colina/mg proteína/min. Los datos se presentan como la media \pm error estándar, valores de cinco experimentos evaluados por triplicado. (**): $P < 0.0005$.

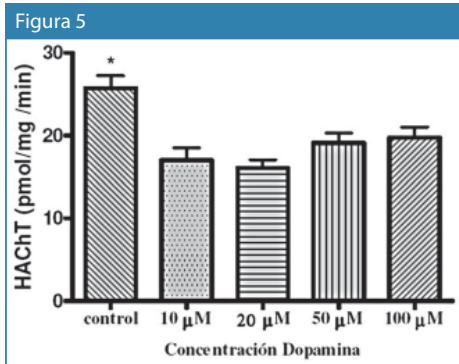
Efecto de la dopamina e IBMX sobre la actividad del HACHT. Los cultivos celulares fueron incubados con $100 \mu\text{M}$ de dopamina y $500 \mu\text{M}$ de IBMX evidenciándose una disminución significativa de la actividad del HACHT. La actividad del HACHT se expresa en pmol de colina/mg proteína/min. Los datos se presentan como la media \pm error estándar, valores de cinco experimentos evaluados por triplicado. (*): $P < 0.0001$.

Figura 4



Posteriormente se procedió a evaluar la posible dosis dependencia de dicho efecto, para lo cual, los cultivos celulares se trataron con concentraciones crecientes de dopamina (10 , 20 , 50 y $100 \mu\text{M}$) y $500 \mu\text{M}$ de IBMX en todos los casos. Estos experimentos confirmaron el efecto inhibitor de la dopamina y el IBMX pero no revelaron respuesta dosis-dependiente para este efecto inhibitor (Fig. 5). En vista de la ausencia de

dosis dependencia, dado que se ha descrito que el aumento de los niveles intracelulares de AMPc en respuesta a la dopamina ocurre de manera dosis-dependiente en retinas de embrión de pollo (DeMello M. C. F. et al. 1982), se procedió a determinar la actividad del HACHT en cultivos tratados con 100 μM de dopamina y 500 μM de IBMX en presencia de un antagonista de los receptores dopaminérgicos tipo- D_1 (1 μM de (+)-SCH23390, 30 minutos) como descrito previamente por DoNascimento J., et al. 1998.



Efecto de concentraciones crecientes de dopamina sobre la actividad del HACHT. Los cultivos celulares fueron incubados con concentraciones crecientes de dopamina en presencia de 500 μM de IBMX en todos los casos, no se encontró diferencia significativa entre los grupos ($P=NS$). La actividad del HACHT se expresa en pmol de colina/mg proteína/min. Los datos se presentan como la media \pm error estándar, valores de cinco experimentos evaluados por triplicado.

Debido a que el bloqueo del receptor dopaminérgico tipo- D_1 falló al modificar el efecto inhibitorio del tratamiento con dopamina e IBMX (ni potenciándolo ni revirtiéndolo) (Fig. 6), se procedió a evaluar el posible efecto de la dopamina endógena sobre la actividad basal del HACHT, a través de los receptores dopaminérgicos tipo- D_1 y D_2 . Para tal propósito se midió la actividad del HACHT en cultivos tratados solamente con antagonistas dopaminérgicos D_1 (1 μM de (+)-SCH23390) o D_2 (2 μM de Raclopride, Guimaraes M. Z. P., et al. 2001), encontrándose que estos tratamientos no modificaron de modo alguno la actividad del transportador (Fig. 7).

Efecto del antagonista dopaminérgico D_1 (+)-SCH23390 sobre la actividad del HACHT. Los cultivos celulares fueron incubados con 100 μM de dopamina y 500 μM de IBMX en presencia y ausencia de 1 μM de (+)-SCH23390. La captación de colina disminuyó de manera significativa en presencia de dopamina e IBMX pero este efecto inhibitorio no se modificó posterior a la incorporación de (+)-SCH23390 ($P=NS$). La actividad del HACHT se expresa en pmol de colina/mg proteína/min. Los datos se presentan como la media \pm error estándar, valores de cinco experimentos evaluados por triplicado.

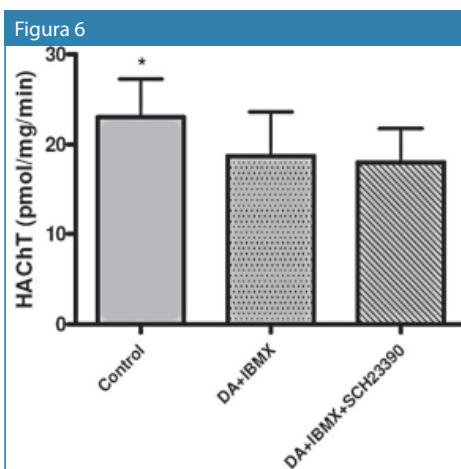
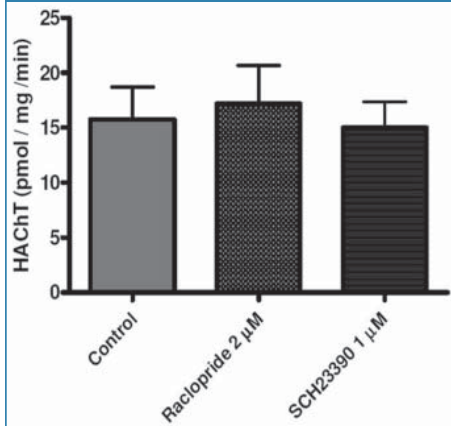


Figura 7



Efecto de la dopamina endógena sobre la actividad del HACHT. Los cultivos celulares fueron incubados con antagonistas dopaminérgicos D_1 y D_2 (SCH23390 y Raclopride respectivamente), no se evidenció una diferencia significativa entre los tres grupos ($P=NS$). La actividad del HACHT se expresa en pmol de colina/mg proteína/min. Los datos se presentan como la media \pm error estándar, valores de cinco experimentos evaluados por triplicado.

En conjunto, estos resultados sugieren que la dopamina no tiene ningún efecto sobre la captación de colina mediada por el HACHT en retinas de embrión de pollo, ni es responsable de una regulación tónica o basal del mismo, siendo el efecto inhibitorio evidenciado debido al tratamiento concomitante con IBMX.

Discusión

Varios grupos de investigadores han propuesto diversos mecanismos de regulación del transportador de colina de alta afinidad (Guyenet et al., 1973; Barker, 1976; Murrin y Kuhar, 1976; Roskoski 1978; Sherman et al., 1978; o'Regan y collier, 1981; Lowestein y Coyle, 1986; Cancela et al., 1995; Issa et al., 1996; Cooke Rylett, 1997; Ferguson et al., 2003 Gates J., et al., 2004), sin embargo, se conoce poco acerca de la regulación del transportador por parte de la vía de señalización AMPc/PKA. En el presente trabajo se demostró que el aumento de los niveles intracelulares de AMPc disminuye de manera significativa la actividad del HACHT en retinas de embrión de pollo, en contraste con los resultados contradictorios de otros investigadores usando otros modelos biológicos (Issa et al., 1996; Volgelsberg, et al., 1997). De particular interés resulta el hallazgo que el tratamiento con dopamina no es capaz de disminuir la actividad del HACHT. El hecho que la dopamina puede aumentar los niveles de AMPc intracelular desde momentos tempranos del período embrionario en retinas de embrión de pollo, a través de receptores dopaminérgicos tipo- D_1 (Marques A y Garcia DeMello F.1990) y dado que en este modelo biológico las células amácrinas son las neuronas colinérgicas (Baughman R. y Bader C., 1977), queda demostrado que las mismas, en cuanto a la actividad del HACHT no pueden ser reguladas por neuronas dopaminérgicas.

Por otra parte, un hallazgo relevante en este estudio es la magnitud de la reducción de la actividad del HACHT en comparación con la obtenida por Gates J., et al. 2004, donde encontraron una reducción del 30% a través de la activación de PKC mediante ésteres de forbol. En el presente estudio utilizando forskolina e IBMX se obtuvo una reducción de la actividad del HACHT cercana al 70%, sin evidencia alguna de daño o muerte celular, esta diferencia notable en cuanto

a la capacidad de inhibir mediante la inducción de proteínas serina-treonina kinasas con respecto a lo obtenido por Gates J., et al. 2004 no puede atribuirse a la diferencia en el modelo biológico empleado pues según lo descrito previamente por Garay et al. 2006 se obtuvo una disminución de la actividad del HACHT cercana al 30% usando ésteres de forbol en retinas de embrión de pollo. Esto permite plantear una regulación conjunta de la actividad del HACHT tanto por la fosforilación mediada por PKA como por PKC, esta hipótesis se ve reforzada por el hecho que Gates J., et al. 2004 al emplear en su modelo biológico Staurosporina (inhibidor de PKC) no obtuvieron cambios en la V_{max} y la densidad en la membrana del HACHT, por otra parte usando ácido okadaico y calyculin A (inhibidores de PP1/PP2A) obtuvieron reducciones de dichos parámetros similares a los obtenidos con ésteres de forbol. Estos hallazgos en conjunto refieren la presencia de un mecanismo de regulación tónica de fosforilación independiente de PKC.

Un estudio reciente reveló que la vía de señalización mediada por AMPc induce una "Downregulation" del ARNm del HACHT en la línea celular colinérgica NSC-19 (Brock et al. 2007), sin embargo, los autores no evaluaron la actividad del transportador, por lo que sus resultados no permiten deducir la regulación sobre la captación de colina, pudiendo interpretarse estos hallazgos, como efectos "a largo plazo" del AMPc sobre la regulación del terminal colinérgico. Además, en el presente trabajo se establece que el AMPc es capaz de regular de manera inmediata la actividad del terminal colinérgico y más específicamente la síntesis de acetilcolina mediante la disminución de la actividad del HACHT, posiblemente por endocitosis clatrina-dependiente (Ribeiro, F M. et al. 2003, Ribeiro, F M et al. 2005)

En conclusión, estos resultados sugieren la regulación de la actividad del HACHT por la vía de señalización AMPc/PKA. Por su parte, el hallazgo que los cultivos celulares tratados con dopamina no mostraron ningún efecto sobre la actividad del HACHT, no excluye la posibilidad que esta pueda actuar como una sustancia reguladora en otras regiones del sistema nervioso central. Se considera que deben ser evaluados otros sistemas de neurotransmisión para obtener información adicional sobre la regulación heteróloga del terminal colinérgico.

Agradecimientos: Al CDCHT de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado por haber financiado este proyecto bajo el 011-ME-2001.

Referencias

- Hans C. Fibiger. Dopaminergic-Cholinergic Interactions in the Striatum. *The Japanese Journal of Psychiatry and Neurology*. 1991; 45.
- S. A. Talanov, N. N. Oleshko, M. N. Tkachenko, and V. F. Sagach. Interaction between Dopaminergic and Cholinergic Systems under Conditions of Deficiency of Mesencephalo-Striatal Dopamine in Rats. *Neurophysiology*. 2005; 37: 403-406.
- Yamamura, H.I. and Snyder, S.H. High-affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. *J. Neurochem*. 1973; 21:1355-1374.
- Joje RS. High affinity choline transport and acetylCoA production in brain and their roles in the regulation of acetylcholine synthesis. *Brain Res*. 1979; 180:313-344.
- Joje RS and Jenden DJ. The utilization of choline and acetyl coenzyme A for the synthesis of acetylcholine. *J Neurochem*. 1980; 35:318-325.
- Blusztajn JK and Wurtman RJ. Choline and cholinergic neurons. *Science*. 1983; 221:614-620.
- Okuda T and Haga T. Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett*. 2000; 484:92-97.
- Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T and Katsuri I. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci*. 2000; 3:120-125 29
- Okuda T and Haga T. High-affinity choline transporter. *Neurochem Res*. 2003; 28:483-488.
- Ferguson SM and Blakely RD. The choline transporter resurfaces: new roles for synaptic vesicles? *Mol Interv*. 2004; 4:22-37.
- Apparsundaram S, Ferguson SM, George AL, Jr. and Blakely RD. Molecular cloning of a human, hemicholinium-3-sensitive choline transporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 276:862-867.
- Apparsundaram S, Ferguson SM and Blakely RD. Molecular cloning and characterization of a murine hemicholinium-3-sensitive choline transporter. *Biochem Soc Trans*. 2001; 29:711-716.
- Fabiola M. Ribeiro, Stefanie A. G. Black, Vania F. Prado, R. Jane Rylett, Stephen S. G. Ferguson y Marco A. M. Prado. The "ins" and "outs" of the high affinity choline transporter CHT. *J. Neurochem*. 2006; 97:1-12.
- Gates J., Jr., Ferguson Shawn M., Blakely D. Randy, Apparsundaram Subbu. Regulation of Choline Transporter Surface Expression and Phosphorylation by Protein Kinase C and Protein Phosphatase 1/2A. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 310(2):536-45.
- Shawn M. Ferguson, Valentina Savchenko, Subbu Apparsundaram, Melissa Zwick, Jane Wright, Craig J. Heilman, Hong Yi, Allan I. Levey, and Randy D. Blakely. Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters. *J Neuroscience*. 2003; 23(30):9697-709.
- De Mello FG. The ontogeny of dopamine-dependent increase of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the chick retina. *J Neurochem*. 1978; 31: 1049-1053.
- De Mello MC, Ventura AL, Paes de Carvalho R, Klein WL, De Mello FG. Regulation of dopamine- and adenosine-dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982; 79(18):5708-12.
- De Mello MC, De Mello FG. Topographical organization of the dopamine-dependent adenylate cyclase of the chick embryo retina. *Brain Res*. 1985; 328(1):59-63.
- DeMello FG, DeMello MC, Hudson R, Klein WL. Selective expression of factors preventing cholinergic dedifferentiation. *J Neurochem*. 1990; 54(3):886-92.
- Guimarães MZ, Hokoç JN, Duvoisin R, Reis RA, De Mello FG. Dopaminergic retinal cell differentiation in culture: modulation by forskolin and dopamine. *Eur J Neurosci*. 2001; 13(10):1931-7.
- Baughman R., Bader C. Biochemical characterization and cellular localization of the cholinergic system in the chicken retina. 1977; 138(3): 469-485.
- Torrao AS, Brito LR. Neurotransmitter regulation of neural development: Acetylcholine and nicotinic receptors. *An Aca Bras Cienc*. 2002; 74(3): 453-461.

23. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193; 265-275.
24. Lankford KL, DeMello FG, Klein WL. D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(12):4567-4571.
25. Doyle SE, McIvor WE, Menaker M. Circadian rhythmicity in dopamine content of mammalian retina: role of the photoreceptors. *J Neurochem* 2002; 83: 211–219.
26. Nowak JZ, Sek B, Schorderet M. Dark-induced supersensitivity of dopamine D-1 and D-2 receptors in rat retina. *Neuroreport* 1991; 2: 429–432.
27. Nir I, Haque R, Iuvone PM. Regulation of cAMP by light and dopamine receptors is dysfunctional in photoreceptors of dystrophic retinal degeneration slow (rds) mice. *Exp Eye Res* 2001; 73: 265–272.
28. Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Documenta ophthalmologica* 2004; 108: 17-40.
29. Do Nascimento JL, Kubrusly RC, Reis RA, De Mello MC, De Mello FG. Atypical effect of dopamine in modulating the functional inhibition of NMDA receptors of cultured retina cells. *Eur J Pharmacol.* 1998; 343(1):103-10.
30. Guimarães MZ, Hokoç JN, Duvoisin R, Reis RA, De Mello FG. Dopaminergic retinal cell differentiation in culture: modulation by forskolin and dopamine. *Eur J Neurosci.* 2001; 13(10):1931-7.
31. Guyenet P, Lefresne P, Rossier J, Beaujouan JC and Glowinski J. Inhibition by hemicholinium-3 of (14C)acetylcholine synthesis and (3H)choline high-affinity uptake in rat striatal synaptosomes. *Mol Pharmacol.* 1973; 9:630-639.
32. Barker LA. Modulation of synaptosomal high affinity choline transport. *Life Sci.* 1976; 18:725-731.
33. Murrin LC and Kuhar MJ. Activation of high-affinity choline uptake in vitro by depolarizing agents. *Mol Pharmacol.* 1976; 12:1082-1090.
34. Roskoski R, Jr. Acceleration of choline uptake after depolarization-induced acetylcholine release in rat cortical synaptosomes. *J Neurochem.* 1978; 30:1357-1361.
35. Sherman KA, Zigmond MJ and Hanin I. High affinity choline uptake in striatum and hippocampus: differential effects of treatments which release acetylcholine. *Life Sci.* 1978; 23:1863-1870.
36. Lowenstein PR and Coyle JT. Rapid regulation of [3H]hemicholinium-3 binding sites in the rat brain. *Brain Res.* 1986; 381:191-194.
37. Cancela JM, Bertrand N and Beley A. Involvement of cAMP in the regulation of high affinity choline uptake by rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 213:944-949.
38. Issa AM, Gauthier S and Collier B. Effects of the phosphatase inhibitors calyculin A and okadaic acid on acetylcholine synthesis and content of rat hippocampal formation. *J Neurochem.* 1996; 66:1924-1932.
39. Cooke LJ and Rylett RJ. Inhibitors of serine/threonine phosphatases increase membrane-bound choline acetyltransferase activity and enhance acetylcholine synthesis. *Brain Res.* 1997; 751:232-238.
40. Marques V. A. L y DeMello F. G. D1 dopamine receptor in neurite regions of embryonic and differentiated retina are highly coupled to adenylate cyclase in the embryonic but not in the mature tissue. *Brain Res.* 1990; 530(2): 301-308.
41. Garay José, Mosquera Elis, Loureiro Nelson, Moreno José A. Efecto de los aminoácidos excitatorios sobre el transportador de colina de alta afinidad en cultivos celulares de retina embrionaria de pollo. *Gaceta de ciencias veterinarias.* 2006; 11 (2)
42. Martina Brock, Ann-Christin Nickel, Beata Madziar, Jan Krzysztof Blusztajn, and Brygida Berse. Differential regulation of the high affinity choline transporter and the cholinergic locus by cAMP signaling pathways. 2007; 1145: 1-10.
43. Ribeiro FM, Alves-Silva J, Volkmandt W, Martins-Silva C, Mahmud H, Wilhelm A, Gomez MV, Rylett RJ, Ferguson SS, Prado VF and Prado MA. The hemicholinium-3 sensitive high affinity choline transporter is internalized by clathrin-mediated endocytosis and is present in endosomes and synaptic vesicles. *J Neurochem.* 2003; 87:136-146.
44. Ribeiro F. M., Black S. A., Cregan S. P., Prado V. F., Prado M. A., Rylett R. J. and Ferguson S. S. Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif. *J. Neurochem.* 2005; 94, 86–96.